

Aus dem Lehrstuhl für
Innere Medizin I
Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling
Der Medizinischen Fakultät
Der Universität Regensburg

Modulation der Immunantwort von Colon Lamina Propria Fibroblasten durch IL-22 bei
Morbus Crohn

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefan Ernst Hajo Loose

2012

Aus dem Lehrstuhl für
Innere Medizin I
Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling
Der Medizinischen Fakultät
Der Universität Regensburg

Modulation der Immunantwort von Colon Lamina Propria Fibroblasten durch IL-22 bei
Morbus Crohn

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefan Ernst Hajo Loose

2012

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Florian Obermeier
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Stefan Fichtner-Feigl
Tag der mündlichen Prüfung:	28. Juni 2012

In Erinnerung an

Heinz Borchers

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	8
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	12
1 EINLEITUNG	14
1.1 Aufbau der Darmwand	14
1.2 Morbus Crohn – ein Überblick.	15
1.2.1 Historischer Rückblick.....	15
1.2.2 Inzidenz.....	16
1.2.3 Klinische Merkmale.....	17
1.2.4 Krankheitsverlauf	18
1.2.5 Ätiologie.....	19
1.2.5.1 Hypothese der infektiösen Genese.....	19
1.2.5.2 Genetische Faktoren.....	20
1.3 Die Rolle des Interleukin 22	22
1.4 IL-22 und Morbus Crohn	25
1.5 Ziel der Arbeit	26
2 MATERIALIEN	27
2.1 Chemikalien und Reagenzien	27
2.2 Zellkultur	28
2.3 ELISA	28
2.3.1 Antikörper	29
2.4 Western Blotting.....	29

2.4.1	Antikörper	30
2.5	Taqman	30
2.6	Sonstige Verbrauchsmaterialien	32
2.7	LaboraAusstattung, Geräte	32
2.8	Interleukine.....	34
2.9	Software.....	34
2.10	Nährmedien, Puffer und Lösungen.....	35
2.10.1	Nährmedien	35
2.10.2	Allgemeine Puffer	36
3	METHODEN.....	38
3.1	Isolierung, Lagerung und Kultivierung von CLPF	38
3.2	Stimulation der CLPF mit IL-22, TNF-α und LPS.....	39
3.3	Western Blotting.....	40
3.4	ELISA	44
3.5	RNA-Isolation.....	45
3.6	Reverse Transkriptase	47
3.7	Taqman-PCR.....	47
4	ERGEBNISSE	51
4.1	Untersuchung humaner CLPF auf deren IL-22-Rezeptor Status	51
4.2	Der Einfluss von IL-22 auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine bei CLPF	52
4.2.1	Untersuchungen zum Dosis-Wirkungseffekt	52
4.2.1.1	Untersuchungen an CLPF aus nicht entzündlichen Kontrollen (KO-CLPF).....	52
4.2.1.2	Untersuchungen an CLPF aus stenosefreien Darmabschnitten von Morbus-Crohn-Patienten (MC-CLPF).....	54

4.2.1.3	Untersuchungen an CLPF aus stenosierten Darmabschnitten von Morbus-Crohn-Patienten (ST-CLPF).....	56
4.2.2	Stimulation der Kontroll-CLPF mit IL-22 und LPS	58
4.2.3	Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse	60
4.2.4	Vergleich der IL-6- und IL-8-Produktion von Kontroll-, MC-, ST- und LPS-kostimulierten Kontroll-CLPF bei Stimulation mit 25 ng/ml IL-22.....	60
4.2.5	Zeitlicher Verlauf der IL-6- und IL-8-Antwort bei Kontroll-CLPF	62
4.2.5.1	Zeitlicher Verlauf bis acht Stunden	62
4.2.5.2	Zeitlicher Verlauf bis 24 Stunden.....	63
4.2.5.3	Zeitlicher Verlauf zwischen acht und 48 Stunden.....	64
4.2.6	Zeitlicher Verlauf bei den LPS-kostimulierten Kontroll-CLPF	65
4.3	Überprüfung der Induktion von pSTAT1, STAT3, pSTAT3 und pSTAT5.....	66
4.4	Fibroseparameter	66
4.4.1	ST-CLPF	66
4.4.1.1	CTGF	66
4.4.1.2	Collagen I	67
4.4.2	MC-CLPF	68
4.4.2.1	CTGF	68
4.4.2.2	Collagen I	69
5	DISKUSSION.....	71
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	76
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	78
8	DANKSAGUNG.....	92
9	CURRICULUM VITAE	93

Abkürzungsverzeichnis

BSA	bovine serum albumin
CED	Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen
CLPF	Colon lamina propria Fibroblasten
CU	Colitis Ulcerosa
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
KO	Kontrolle
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
MC	Morbus-Crohn
NSCL	Non-Small-Cell-Lung
ST	Morbus-Crohn-Stenose
n	Anzahl
NEA	Nicht essentielle Aminosäuren
p	Signifikanz
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBST	tris buffered saline and Tween 20
TGF	transforming growth factor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TNF

w/v

Tumor Nekrose Faktor

Gewicht/Volumen

1 Einleitung

1.1 Aufbau der Darmwand

Die Wand des menschlichen Verdauungstraktes ist in allen Abschnitten aus vier Geweben aufgebaut, die in Schichten übereinander liegen. Vom Lumen nach außen gehend ist sie aus der Schleimhaut (Tunica mucosa, Mukosa), der submukösen Bindegewebsschicht (Tela submucosa, Submukosa), der Muskelhaut (Tunica muscularis, Muskularis) und der Tunica serosa (Serosa) bzw. Tunica adventitia (Adventitia) aufgebaut. Die Mukosa wird nochmals in mehrere Schichten unterteilt. Sie besteht vom Lumen ausgehend aus einer Epithelzellschicht, die je nach Darmabschnitt vom Aufbau her sehr variiert. Darunter folgt die Lamina propria, die aus Fibroblasten, Makrophagen, Plasmazellen, Lymphozyten, Granulozyten, Blut- und Lymphgefäßen besteht. Der Lamina propria liegt die Lamina muscularis mucosae an. Sie ist die lumenentfernteste Schicht der Mukosa, besteht aus glatten Muskelzellen und ermöglicht der Mukosa eine eigene Motilität und Konturveränderung. Der Mukosa folgt die Submukosa. Hier liegt der Meissner-Plexus, der die Motilität der inneren Wandschicht des Darms steuert und weitere Blut- und Lymphgefäße. Der Submukosa liegt die Muskularis auf. Diese besteht aus einer inneren zirkulären und einer äußeren longitudinalen Schicht. Zwischen der zirkulären und der longitudinalen Schicht liegt der Auerbach-Plexus, der die Peristaltik der Muskularis steuert. Nach außen hin wird die Darmwand von der Serosa begrenzt, welche aus vielen Blutkapillaren und Lymphgefäßen besteht.

Die Aufgaben des menschlichen Verdauungstraktes sind neben der Aufnahme von Nahrungsstoffen, auch die Auseinandersetzung mit potentiell schädlichen Organismen. Mit einer Oberfläche von ca. 300 m² ist der Verdauungstrakt die größte Kontaktfläche des menschlichen Organismus zur Umwelt. Allein die große Kontaktfläche an sich stellt das Immunsystem vor eine enorme Herausforderung. Dieser Herausforderung begegnet das Immunsystem mit einer komplexen Interaktion verschiedener Zellen und Faktoren, die bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht im Ganzen verstanden sind. Auch die andauernde Konfrontation mit verschiedensten

pathogenen Keimen, Stoffen, etc. fordert enorme Fähigkeiten vom menschlichen Organismus. Dass es hier zu Pathologien kommen kann, ist nicht verwunderlich.

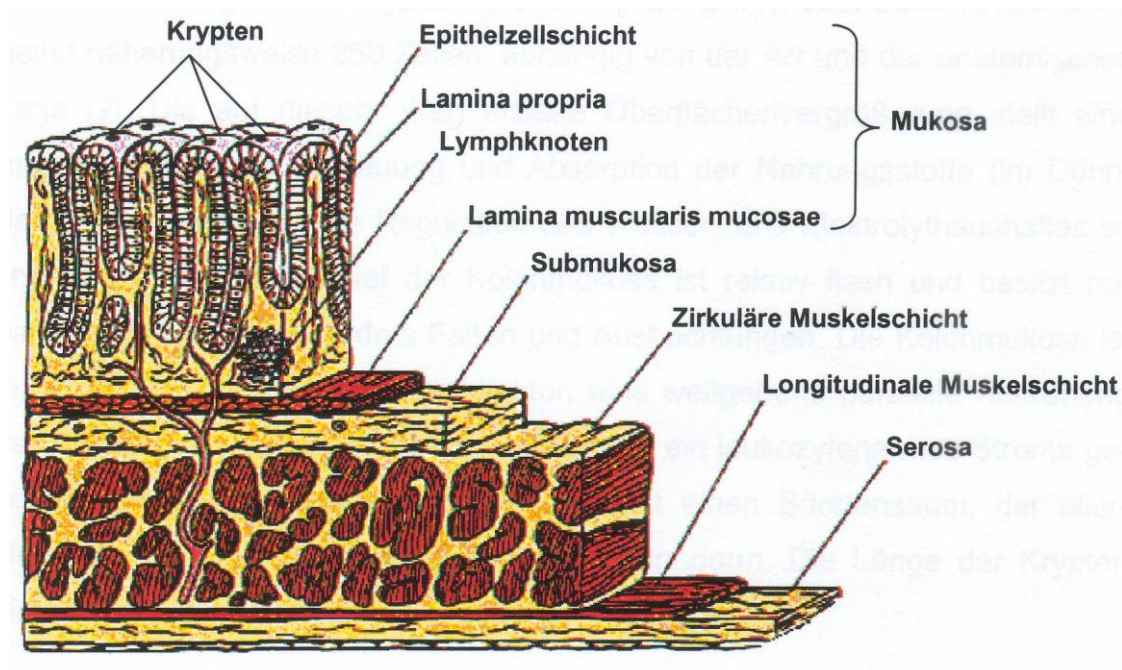


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Colonmukosa¹

1.2 Morbus Crohn – ein Überblick.

Morbus Crohn (MC) fällt zusammen mit der Colitis Ulcerosa (CU) in die Gruppe der Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Bei Morbus Crohn handelt es sich um eine chronisch-granulomatöse transmurale Entzündung, die diskontinuierlich im gesamten Gastrointestinal-Trakt auftreten kann. Bevorzugt befallen sind das terminale Ileum und das proximale Colon.² Die Colitis Ulcerosa hingegen breitet sich mit Ulzerationen der oberflächlichen Schleimhaut kontinuierlich vom Rektum nach proximal im Colon aus.³

1.2.1 Historischer Rückblick

Die Aufzeichnungen von vermutlichen Morbus Crohn Patienten gehen zurück bis in das 17. Jahrhundert. 1612 lässt der Autopsiebericht von Wilhelm Fabrys⁴ einen

Morbus Crohn Fall vermuten.⁵ Medizinhistoriker⁶ behaupten, dass Befunde von Giovanni Battista Morgagni⁷ im Jahr 1769 über einen mit 20 Jahren verstorbenen Mann, der an Diarrhoe und Fieber litt, auf einen Morbus Crohn hinweisen. Bei der damaligen Autopsie wurden Ulcera, vergrößerte Lymphknoten und eine Perforation des terminalen Ileums gefunden. Jedoch kann man bei diesen Fällen auch eine infektiöse oder tuberkulöse Erkrankung nicht ausschließen.

Die erste wirkliche klare Differenzierung gelang T.K. Dalziel⁸ im Jahr 1913. Er unterschied eine chronisch entzündliche Schleimhautveränderung mit unspezifischen Granulozyten im terminalen Ileum von einer Darmtuberkulose. Diese Erkrankung bekam den Namen „Chronic Interstitial Enteritis“.

B.B. Crohn vom Mount Sinai Hospital in New York beschrieb zusammen mit L. Ginzburg und G. Oppenheimer⁹ die charakteristischen Merkmale der nicht tuberkulösen Ileitis terminalis. Als Leitsymptome galten Episoden von Diarrhoe, Fieber, Unterbauchschmerzen und Gewichtsverlust. Auch beschrieben sie als auffällige Symptome Anämie, auffälliger Palpationsbefund in der rechten Iliakalregion, Obstruktion sowie innere und äußere Fisteln.

Heutzutage wird Morbus Crohn als eine chronische Erkrankung beschrieben. Bezüglich der Ätiologie und Pathophysiologie sind immer noch viele Fragen unbeantwortet.

1.2.2 Inzidenz

Je nach geographischer Lage variiert die Inzidenz von Morbus Crohn.¹⁰ So tritt Morbus Crohn gehäuft in der paläarktischen Zone mit gemäßigtem Klima auf.¹¹ In Asien ist die Inzidenz um einiges niedriger als in Europa und den USA.¹²

Die Inzidenz in Japan lag 1991 bei 0,51 pro 100.000 Einwohner pro Jahr.¹³ Im Jahr 1965 betrug sie noch 0,01 pro 100.000 Einwohner pro Jahr.¹⁴ Die Ursachen des Inzidenzanstiegs sind jedoch unklar.

In einer Arbeit vom Olmsted County in Minnesota, USA, lag die Inzidenz für Morbus Crohn im Zeitraum von 1940 bis 1993 bei 5,8 pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Laut

dieser Untersuchung hielt sich die Inzidenz-Rate seit 1970 stabil und es kam zu keinem weiteren Anstieg der Inzidenz-Rate.¹⁵

Die altersstandardisierte Inzidenz in Europa liegt bei 5,6 pro 100.000 Einwohner. In einer großen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz im nördlichen Europa bis zu 40% höher ist. So liegt die höchste Inzidenz für Morbus Crohn in den Niederlanden bei 9,2 pro 100.000 Einwohner und die niedrigste im Nordwesten Griechenlands bei 0,9 pro 100.000 Einwohner.¹⁶

Nach einer populationsbasierten Studie aus dem Jahr 2008 liegt die altersstandardisierte Inzidenz für Morbus Crohn in der Oberpfalz bei 6,6 pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Die höchste altersspezifische Inzidenz in dieser Studie war mit 18,5 pro 100.000 Einwohner pro Jahr in der Altersgruppe von 16 bis 25 Jahren.¹⁷

1.2.3 Klinische Merkmale

Die Symptome des Morbus Crohn sind abhängig von der Ausdehnung, Lokalisation und Ausprägung der Entzündung der betroffenen Darmabschnitte. Patienten, die eine Beteiligung des Ileums und Colons haben, leiden unter abdominellen Schmerzen, die bei der Untersuchung häufig eine Abwehrspannung im Unterbauch zeigen.

Patienten, bei denen der gastroduodenale Morbus Crohn imponiert, stellen sich mit früh eintretendem Völlegefühl, Übelkeit, Erbrechen, epigastrischen Schmerzen und Dysphagie vor. Wegen der postprandialen Schmerzen und der verzögerten Magenentleerung reduzieren Patienten mit gastroduodenalem Morbus Crohn oft die Nahrungsaufnahme.

Ist der Dünndarm mit betroffen, hat dieses diffuse abdominelle Schmerzen, Appetitlosigkeit, unblutige Diarrhoe und Gewichtsverlust zur Folge und kann unter Umständen zu einer Lactosemalabsorption führen. Während eines akuten Schubes können eine diffuse Abwehrspannung des Abdomens und Fieber auftreten.

Bei Morbus Crohn-Patienten, bei denen das Colon betroffen ist, kann es auch zu einer Colitis Ulcerosa ähnlichen Symptomatik kommen, indem sich der Morbus

Crohn in Form blutiger, schleimiger Durchfälle verbunden mit Krämpfen im Bereich des unteren Abdomens, die häufig durch Defäkation erleichtert werden, präsentiert.¹⁸ Dies kann die klinische Differenzialdiagnose von Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa erschweren. Entscheidend sind dann die Endoskopie und Histologie.

Auch extra-intestinale Manifestationen wie die Iritis, Uveitis, Arthritis, ankylosierende Spondylitis, Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum und primär sklerosierende Cholangitis sind bei Morbus Crohn-Patienten zu finden. Diese können schon vor Auftreten intestinaler Symptome vorhanden sein und zum Teil in ihrer Aktivität völlig unabhängig vom klinischen Verlauf des Morbus Crohn sein.^{19, 20} In einer Auswertung der CED-Datenbank der Universität Manitoba, Kanada, zeigten 6,2% der CED-Patienten extraintestinale Symptome.²¹

1.2.4 Krankheitsverlauf

Der Verlauf der Erkrankung ist meist schubweise mit einer Rezidivhäufigkeit von 30% nach einem und 70% nach zwei Jahren. Im Falle der Persistenz der Krankheitssymptome über sechs Monate wird von einem chronisch-aktiven Verlauf gesprochen.

Alter bei Diagnosestellung	A1, <16 Jahre
	A2, 17 - 40 Jahre
	A3, >40 Jahre
Lokalisation	L1, terminales Ileum
	L2, Colon
	L3, Ileocolon
	L4, oberer GI-Trakt
	L4+, unterer GI-Trakt und distale Erkrankung
Krankheitsverhalten	B1, nicht-stenosierend nicht penetrierend
	B2, stenosierend
	B3, intern penetrierend
	B3p, perianal penetrierend

Tabelle 1: Die Montreal-Klassifikation des Morbus Crohn²²

Nach der Montreal-Klassifikation (Tabelle 1) werden die Morbus Crohn-Patienten in verschiedene Untergruppen aufgeteilt. In diese Klassifikation fließen das Alter bei Diagnosestellung, die Lokalisation und das Krankheitsverhalten ein.^{22, 23}

Im Verlauf der Erkrankung entwickeln 12% bis 54% der Morbus Crohn-Patienten eine Darm-Stenose und nach verschiedenen Literaturangaben, auch je nach Lokalisation des Morbus Crohn-Befalls zwischen 17% und 69% eine Fistel.²⁴⁻²⁹ Nach einer französischen Studie, die 2002 Morbus Crohn-Patienten beinhaltete, fiel die Mehrheit der Patienten am Anfang mit einem inflammatorischen Krankheitsverhalten auf. Innerhalb von zwanzig Jahren nach Diagnosestellung waren bei 12% inflammatorisches, bei 18% stenosierendes und bei 70% ein penetrierendes Krankheitsverhalten zu beobachten.³⁰

1.2.5 Ätiologie

Beim Morbus Crohn spielen Umweltfaktoren, hohe häusliche Hygienestandards während der Kindheit, genetische Faktoren und weitere Risikofaktoren wie Rauchen eine wichtige Rolle.^{2, 31} Dass Rauchen ein entscheidender Risikofaktor sowohl für die Entwicklung als auch für den Verlauf darstellt, ist an Untersuchungen zu erkennen, die bei Rauchern ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Fisteln und Stenosen beobachtet hat. Darüber hinaus kommt es bei Rauchern zu einer höheren Anzahl an chirurgischen Eingriffen, die im Krankheitsverlauf schon früher als bei Nichtrauchern durchgeführt werden müssen.³²

Häufige Magen-Darm-Erkrankungen in der Kindheit besitzen einen protektiven Effekt, wobei eine dadurch eventuell erhöhte Einnahme von Antibiotika den schützenden Effekt wiederum verringern kann.³³

1.2.5.1 Hypothese der infektiösen Genese

Es liegen mehrere Fallberichte vor, die eine mögliche infektiöse Ursache vermuten lassen. So gibt es einzelne Fallberichte über Ehepaare, bei denen beide Partner

erkrankten. Hierbei hatte einer der beiden bereits Symptome vor der Ehe. Nach einiger Zeit erkrankte dann auch der Partner an Morbus Crohn.³⁴⁻³⁷

Neuere Forschungsergebnisse legen eine Assoziation mit *Mycobakterium avium paratuberculosis* nahe. Es gibt in der Veterinärmedizin eine dem Morbus Crohn ähnliche Erkrankung, die mit schweren Durchfällen und starkem Gewichtsverlust einhergeht. Die Ursache dieser sogenannten Johne's Disease ist eine Infektion mit dem *Mycobakterium avium paratuberculosis*. Dieser Erreger tritt auch in die Milch des infizierten Rindes über.¹¹ Auch andere Erreger stehen in der Diskussion. Hierzu zählen unter anderem *Helicobacter canis*, Adherent-invasive *Escherichia coli* und *Campylobacter concisus*.³⁸⁻⁴¹ Bezüglich der beiden letztgenannten Erreger liegen Studien über bei Morbus Crohn-Patienten eingesetztes Rifaximin vor. Dieses ist ein gegen *Escherichia Coli* und *Campylobacter* wirksames nicht absorbierbares Antibiotikum. Bei drei Studien konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Rifaximin bei Morbus Crohn-Patienten zu einer Besserung der Symptome führt.⁴²⁻⁴⁴

1.2.5.2 Genetische Faktoren

Zwar spielen exogene Faktoren eine wichtige Rolle bei der Ätiologie des Morbus Crohn, jedoch konnte in einer deutschen Studie mit einer Zwillings-Kohorte auch ein genetischer Einfluss postuliert werden. Der genetische Einfluss ist sogar größer als bei der Colitis Ulcerosa.⁴⁵ Nach einer retrospektiven Studie aus Kopenhagen besitzen die erstgradig Verwandten von Morbus Crohn Patienten ein zehnfach höheres Risiko an dem gleichen Leiden zu erkranken.⁴⁶

Genom-weite Untersuchungen haben ergeben, dass unter anderem Gen-Loci, die STAT3, JAK2, ICOSLG, CDKAL1 und ITLN1 beinhalten, bei Morbus Crohn-Patienten eine Rolle spielen.⁴⁷ Vor allem die NOD2(CARD15)-Genvarianten haben einen Einfluss auf das Risiko für Morbus Crohn.^{48, 49} Es sind drei häufigere Mutationen des NOD2-Gens mit Morbus Crohn assoziiert worden. Bei 27 selteneren Mutationen des NOD2-Gens steht eine weitere Prüfung bezüglich der Assoziation mit der Erkrankung noch aus.⁵⁰ Beim Ileum-Crohn fällt eine Assoziation mit dem Autophagiefaktor ATG16L1⁵¹⁻⁵⁴ und dem Wnt Signalwegfaktor TCF4 auf.⁵⁵ Letzteres zeigte die stärkste

Assoziation bei einem stenosierendem Verlauf. Sowohl ATG16L1 als auch TCF4 zeigten jedoch keinerlei Assoziation zum Colon-Crohn.^{56, 57} In einer Untersuchung wurde die Assoziation zwischen NOD2, IBD5, DLG5, ATG16L1, IL23R und Morbus Crohn analysiert. Es zeigte sich, dass Morbus-Crohn Patienten mehr Risiko-Allele trugen als gesunde Kontrollen. Auch die Patienten, die an einer schweren Form der Erkrankung litten, schon früh (<40a) an Morbus Crohn erkrankten oder eine chirurgische Therapie benötigten, trugen mehr Risiko-Allele als Morbus Crohn-Patienten, die spät erkrankten, an einer leichten Form des Morbus Crohn litten oder keine chirurgische Therapie benötigten.⁵⁸

1.3 Die Rolle des Interleukin 22

Das Interleukin 22 (IL-22), auch früher unter dem Namen IL-TIF bekannt, wurde im Jahr 2000 erstmals kloniert und ist Teil der IL-10-Familie. Es ist ein 179 Aminosäuren langes α -helikales Protein und zu 22% identisch mit der Aminosäuresequenz des Interleukin 10. Das IL-22 codierende Gen ist in der Nähe des IFN- γ -Gens und IL-26 auf Chromosom 12q15.⁵⁹⁻⁶¹ IL-22 wird überwiegend von TH17-, TH22- und TH1-Zellen aber auch von CD8⁺ T-Zellen, CD11c⁺-Zellen, NKp46-Zellen und Lymphoid-Tissue-Inducer-Zellen (LTi-Zellen) produziert.⁶²⁻⁷⁵ Folglich setzen sowohl Zellen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems IL-22 frei. Die Produktion des Interleukins wird je nach IL-22-freisetzenden Zelltypus und konfrontierendem Erreger durch IL-1 β , IL-6, IL-9, IL-12, IL-15, IL-23, TGF- β oder TNF- α induziert.^{69, 76-80}

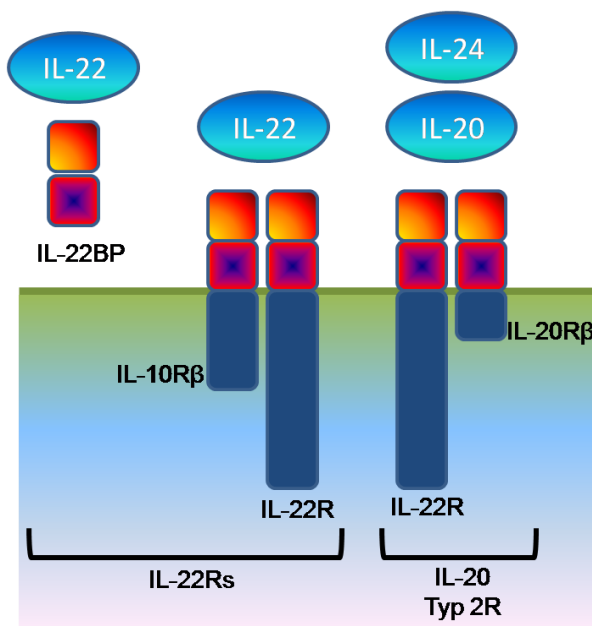


Abbildung 2: IL-22Rs und IL-20 Typ 2R mit ihren Liganden

Der IL-22-Rezeptor ist ein heterodimerer transmembranöser Rezeptorkomplex. Dieser Komplex ist ein Klasse-II-Zytokin-Rezeptor, der aus der IL-22RA1- und IL10R2-Untereinheit, auch bekannt als IL-10R β , besteht.^{81, 82} Die IL-22RA1-Untereinheit findet sich jedoch nicht nur beim IL-22-Rezeptor, sondern auch in Kombination mit der IL-20R β - bzw. IL-20R2-Untereinheit bei einem Rezeptor, an den die Interleukine IL-20 und IL-24 binden (Abbildung 2).^{83, 84} Die IL10R2-Untereinheit ist

Bestandteil der Rezeptoren für IL-10, IL-22, IL-26, IL-28 α , IL-28 β und IL-29. Die IL-22RA1-Untereinheit kann bei den Rezeptoren für IL-20, IL-22 und IL-24 auf gewebeständigen Zellen, insbesondere bei denen epithelialer Herkunft nachgewiesen werden.^{61, 85, 86}

Bisher konnte keine IL-22-Produktion von nicht-hematopoetischen Zellen beobachtet werden. Desweiteren liegen keine Studien darüber vor, dass Immunzellen auf die Gabe von IL-22 reagieren und es konnte auch noch kein IL-22-Rezeptor auf ihnen nachgewiesen werden.^{63, 87-89} Im Gegensatz dazu konnte bei subepithelialen Myofibroblasten⁹⁰, Azinuszellen, Hepatozyten und Keratinozyten eine starke Reaktion auf IL-22 nachgewiesen werden.^{61, 85} Damit lässt sich IL-22 als „Kommunikations-Molekül“ zwischen Immunsystem und Bindegewebszellen bezeichnen.

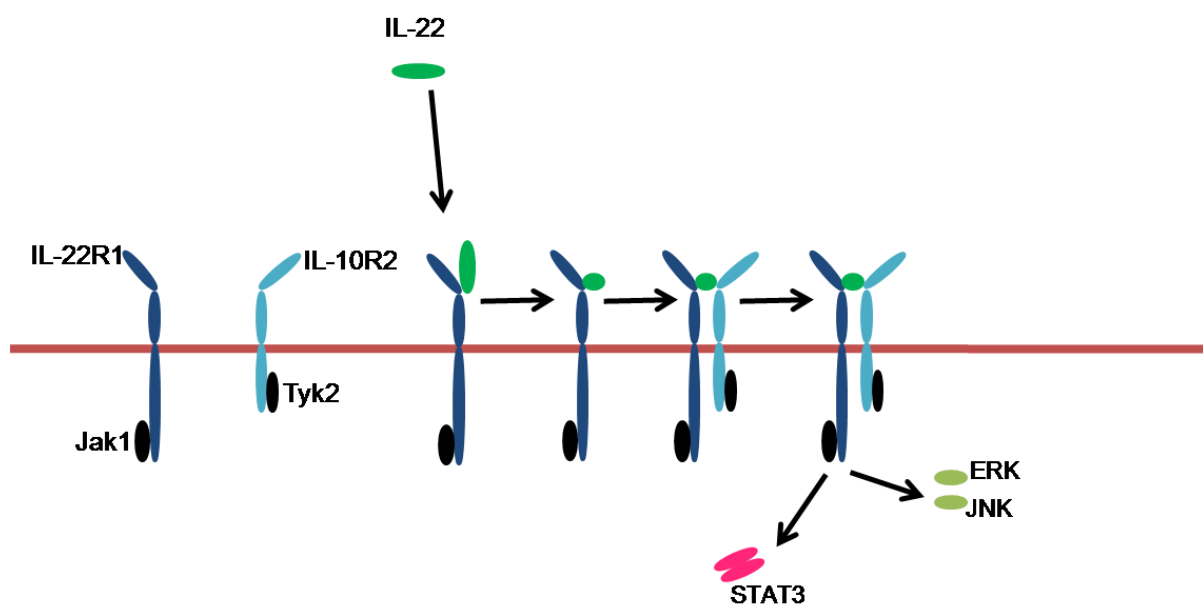


Abbildung 3: Die Bindung von IL-22 an den heterodimeren Rezeptor und den darauffolgenden Signalweg.

IL-22 bindet zuerst an die IL-22R1-Untereinheit und bildet den IL-22/IL-22R1-Komplex. Erst jetzt bildet sich eine Bindungs-Konstellation, an die die IL-10R2-Untereinheit binden kann und somit der IL-22/IL-22R1/IL-10R2-Komplex entsteht.⁹¹⁻⁹³ Daraufhin kommt es zur Phosphorylierung der Tyrosin-Kinasen Jak1 und Tyk2. Diese Kinasen aktivieren wiederum STAT3 und in geringerem Ausmaß STAT1 und STAT5 (Abbildung 3).^{65, 82, 94} Außerdem werden auch drei große MAP-Kinase-Signalwege

aktiviert: p38, MEK-ERK-RSK und JNK-SAPK.⁹⁴ Es kommt zu einer vermehrten Expression von proinflammatorischen Faktoren, wie zum Beispiel dem Interleukin-6, Interleukin-8, Akut-Phase-Proteine, anderen Chemokinen und Zytokinen. Des Weiteren kommt es zur vermehrten Bildung von antimikrobiellen Peptiden, wie β -Defensinen und Proteinen aus der S100-Familie. (Abbildung 4)

Es konnte auch bei Non-Small-Cell-Lung-Carcinom-Zellen ein anti-apoptotischer Effekt durch IL-22 nachgewiesen werden.⁹⁵ Bei Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass auch die zelluläre Mobilität durch die Induktion von Matrix-Metalloproteinase-1, Matrix-Metalloproteinase-3, PDGF und einiger anderer Faktoren erhöht wird und diese für die Wundheilung sehr wichtig sind.^{89, 90, 96-98}

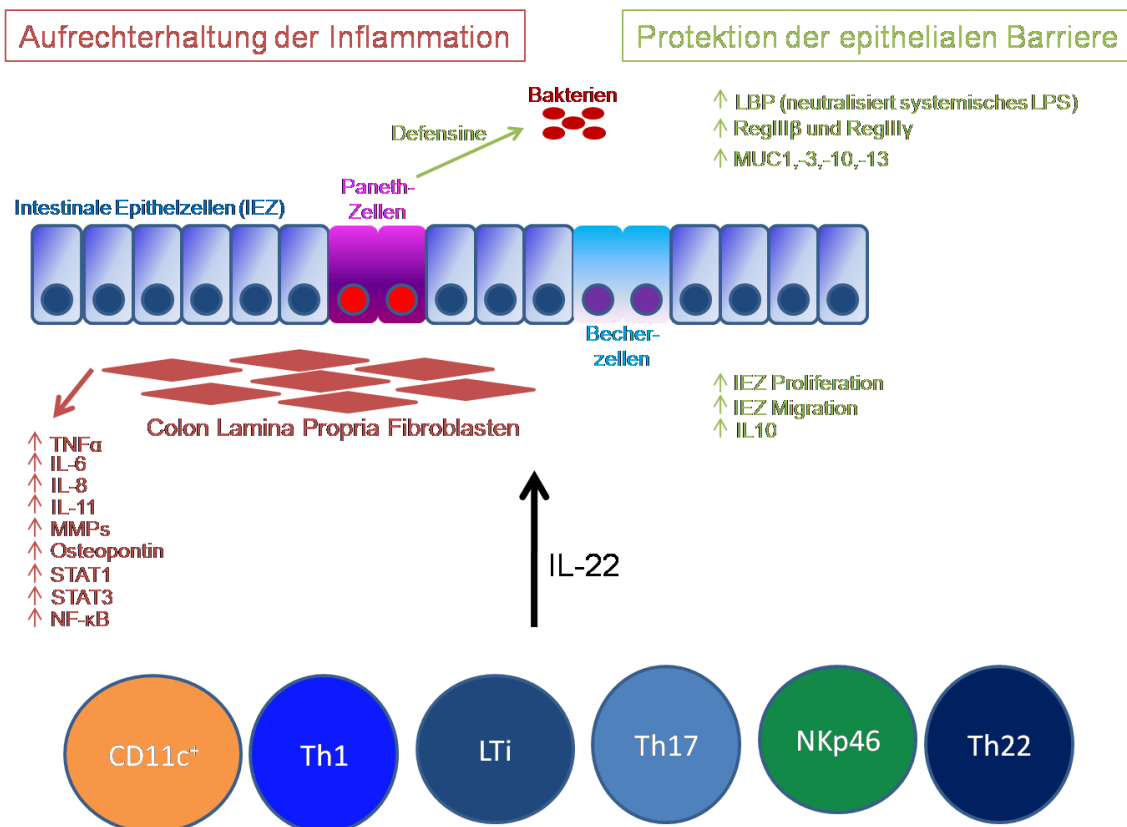


Abbildung 4: Auswirkung von IL-22 auf die Colon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF) und die Intestinalen Epithelzellen.

Weitere Untersuchungen führten zum Nachweis eines löslichen IL-22 Rezeptor, IL-22BP, oder auch IL-22RA2 genannt (Abbildung 2). Bei Gabe von LPS kam es zu einer vermehrten Expression des IL-22BP.⁹⁹ In vitro zeigte sich durch die Bindung

von IL-22 an IL-22BP eine Neutralisation der biologischen Aktivität von IL-22.¹⁰⁰⁻¹⁰² Es konnte eine Expression des IL-22BP unter anderem bei Epithelzellen und Monozyten im Intestinaltrakt nachgewiesen werden.^{99, 102, 103} Es wurde in früheren Experimenten beobachtet, dass es bei einer vermehrten Expression von IL-22 in der Recovery-Phase bei einer DSS-Colitis zu einer Herunter-Regulation des IL-22BP kommt. Im Falle einer Neutralisation von IL-22 durch IL-22BP kam es zu einer vermehrten Ulzeration der Colon-Schleimhaut.¹⁰⁴

Im Gesamtkontext verschiedener Infektionen zeigte sich die Bedeutsamkeit von IL-22.^{69, 105} Es konnte in einer Untersuchung nachgewiesen werden, dass IL-22 für die Immunabwehr gegen *Citrobacter rodentium* erforderlich ist.^{68, 69, 105} Dass IL-22 nicht nur im Magen-Darm-Trakt eine essentielle Bedeutung hat, konnte bei einer Untersuchung mit einer durch *Klebsiella pneumoniae* ausgelösten Pneumonie postuliert werden. Hierin zeigte sich bei Mäusen, bei denen IL-22 durch Antikörper neutralisiert wurde, dass diese bereits nach 24 Stunden verstarben.¹⁰⁶ Kürzlich konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass durch NK-Zellen produziertes IL-22 das Wachstum von *M. tuberculosis* hemmt.⁷⁹

IL-22 scheint somit eine zentrale Rolle in der Immunabwehr, insbesondere bezüglich der endo- und epithelialen Funktionalität und Integrität des menschlichen Organismus zu spielen.

1.4 IL-22 und Morbus Crohn

Bei unterschiedlichen Autoimmun-Erkrankungen wurde eine vermehrte Expression von IL-22 festgestellt. Während in der Colon-Mukosa gesunder Menschen kein IL-22 nachweisbar war, konnte in der Colon-Mukosa von CED-Patienten eine IL-22-Expression detektiert werden. Diese Expression war bei Crohn-Patienten deutlicher zu erkennen als bei Colitis Ulcerosa-Patienten.⁹⁰ Auch in CED-Mausmodellen konnte eine vermehrte Expression von IL-22 nachgewiesen werden.¹⁰⁷ Im Gegensatz dazu war die Expression des IL-22BP in entzündetem Darmgewebe vermindert.¹⁰⁸ IL-22 war im Gegensatz zu IL-17 und IFN- γ bei Morbus-Crohn-Patienten in hoher Menge im Blut nachweisbar und auch die Erkrankungs-Aktivität korreliert mit der Serum-

Konzentration von IL-22.^{108, 109} IL-23R-Genvarianten, bei denen ein erhöhtes Risiko für Morbus Crohn vorlag, zeigten eine erhöhte Serum-Konzentration von IL-22 gegenüber IL-23R-Genvarianten, die ein vermindertes Risiko für Morbus Crohn besaßen.¹⁰⁹

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob Colon-Lamina-Propria-Fibroblasten (CLPF) nach Stimulation mit IL-22 proinflammatorische Zytokine sezernieren und ob es einen Unterschied bei der IL-22-stimulierten Expression von IL-6 und IL-8 zwischen nicht entzündlichen Kontrollen und CLPFs von an Morbus Crohn erkrankten Menschen gibt. Weiterhin werden mögliche Unterschiede zwischen CLPF aus Resektaten mit Stenosen und nicht stenosierte Darmabschnitten von Morbus Crohn Patienten analysiert. Daran anschließend soll ermittelt werden, ob IL-22 einen Einfluss auf die Expression von Faktoren hat, die die Fibrose und damit die Entstehung struktureller Schäden wie Stenosen beeinflussen können.

2 Materialien

2.1 Chemikalien und Reagenzien

2-Mercapto-Ethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Complete Mini	Roche, Mannheim
Deoxycholsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Fetal Calf Serum (FCS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Fisher Scientific, Pittsburgh/USA
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	J.T. Baker, Deventer/Holland
Natriumpyruvat	PAA Laboratories GmbH, Pasching/Österreich
RPN 800V (Marker)(Full range Rainbow recombinant protein molecular marker)	Amersham™ GE Healthcare, Buckinghamshire/UK
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
SDS (<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)	Roth, Karlsruhe
Tris (Trishydromethylaminomethan)	USB Corporation, Cleveland/USA

Trypanblau 0,5% (w/v)

Biochrom, Berlin

2.2 Zellkultur

Amphotericin B

Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Ciprofloxacin

Bayer, Leverkusen

DMEM 4,5 g/l Glucose

PAA Laboratories GmbH,
Pasching/Österreich

Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca^{2+} und
 Mg^{2+}

PAA Laboratories GmbH,
Pasching/Österreich

Gentamycin

PAA Laboratories GmbH,
Pasching/Österreich

Natriumpyruvat

PAA Laboratories GmbH,
Pasching/Österreich

Nichtessentielle Aminosäuren

PAA Laboratories GmbH,
Pasching/Österreich

Penicillin / Streptomycin

PAA Laboratories GmbH,
Pasching/Österreich

Quantum 333 for Fibroblasts with L-
Glutamine

PAA Laboratories GmbH,
Pasching/Österreich

Trypsin (10x)

PAA Laboratories GmbH,
Pasching/Österreich

2.3 ELISA

Human IL-6 ELISA Set

BD Biosciences, San Diego/USA

IL-8 Standard	R&D Systems, Minneapolis/USA
TMB Substrate Reagent Set	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

2.3.1 Antikörper

Capture Antibody Purified anti-human	Human IL-8 Mab 1 mg/ml, Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
Detection Antibody Biotin anti-human	Human IL-8 Biotin Labeled Mab, clone C-IL8-1 (I8-S2) 0,5 mg/ml, Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
Enzyme Concentrate Streptavidin-HRP	BD OptEIA™, BD Biosciences Pharmingen, San Diego/USA

2.4 Western Blotting

Antioxidant	Invitrogen Coporation, Carlsbad/USA
Bicinchonin Säure	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
BCA-Lösung	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Bovine Serum Albumin (BSA)	Biomol, Hamburg
ECL-Plus™ Western Blotting Detection Kit	Amersham, Buckinghamshire/GB
Kupfer (II) Sulfat Pentahydrat 4% Lösung	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NuPage® Transferpuffer (20x)	Invitrogen Coporation, Carlsbad/USA

NuPage® MOPS SDS Laufpuffer	Invitrogen Coporation, Carlsbad/USA
Re-Blot Plus Strong	Chemicon International, Temecula/USA
Triton-X 100	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

2.4.1 Antikörper

Anti-human-IL-10R β	R&D Systems, Minneapolis/USA
Anti-human-IL-22R	R&D Systems, Minneapolis/USA
pSTAT1	Cell Signaling Technology, Danvers/USA
pSTAT3	Cell Signaling Technology, Danvers/USA
pSTAT5	Cell Signaling Technology, Danvers/USA
STAT1	Cell Signaling Technology, Danvers/USA
STAT3	Cell Signaling Technology, Danvers/USA
Goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
β -Actin Antikörper	Millipore, Temecula, USA
MSx Actin MAB 1501	Chemicon International, Temecula/USA

2.5 Taqman

RNeasy® Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden
T3-Thermocycler	Biometra, Göttingen

Thermocycler

Applied Biosystems, Darmstadt

2.6 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Cell-Scraper	Corning Incorporated, Corning/USA
Deckgläser 20 x 26mm	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Einmal-Pipetten steril	Corning Incorporated, Corning/USA
ELISA-Coating-Platten	Thermo Fisher Scientific, Roskilde/Dänemark
Gel (1,0mm)-Kassette 4-12% Bis-Tris Gel mit Kamm	Invitrogen Corporation, Carlsbad/USA
Hyperfilm ECL tm	Amersham, Buckinghamshire/GB
Nitrozellulosemembran, Filterpapier Sandwich	Invitrogen Corporation, Carlsbad/USA
Petrischalen	Corning Incorporated, Corning/USA
Pinzetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2,0ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15ml, 50ml)	Falcon, Heidelberg
Stimulationsplatten (12 well)	Corning Incorporated, Corning/USA
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Corning Incorporated, Corning/USA
Zellzählkammer	Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf

2.7 Laborausstattung, Geräte

Autoclav sanoclav	Wolf, Geislingen
-------------------	------------------

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Durchlichtmikroskop	Leica, Wetzlar
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Electrophoresis Power Supply	Amersham, Buckinghamshire/GB
ELISA-Reader	MWG Biotech, Denkendorf
Hypercassette (Filmkassette)	Amersham, Buckinghamshire/GB
Laborwaage	Sartorius, Göttingen
Lamin Air Sterilbank	Heraeus, Hanau
Magnetrührer	Heidolph, Kehlheim
Millipore Wasserfiltrationsanlage	Millipore Corporation, Billerica/USA
pH-Meter	Schott AG, Mainz
Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Schüttelapparat	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Mixer	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Wärmethermostat	Lauda, Lauda-Königshofen
Western-Blot Entwicklertasche (Curix 60)	AGFA, Leverkusen
XCell II tm	Invitrogen Corporation, Carlsbad/USA
XCell Sure Lock	Invitrogen Corporation, Carlsbad/USA
Zentrifuge, Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg

Zentrifuge, Biofuge fresco

Heraeus, Hanau

Zentrifuge, Mikro

G. Kisker GbR, Mühlhausen

Zentrifuge, Multifuge 3 S-R

Heraeus, Hanau

2.8 Interleukine

Recombinant Human IL-22

R&D Systems, Minneapolis/USA

LPS aus E. coli

SIGMA-Aldrich, Steinheim

TNF α

R&D Systems, Minneapolis/USA

2.9 Software

Office 2007

Microsoft, Redmond/ USA

SigmaPlot 11.0

Systat Software, Erkrath

Softmax

MDS Analytical Technologies,
Mississauga Intario/Canada

2.10 Nährmedien, Puffer und Lösungen

2.10.1 Nährmedien

Zellkulturmedium für CLPF

500	ml	Quantum 333 for Fibroblasts with L-Glutamine
5	ml	Penicillin/Streptomycin
2	ml	Ciprofloxacin
500	µl	Amphotericin B, 1mg/ml
500	µl	Gentamycin

Stimulationsmedium für CLPF

500	ml	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose 4,5 g/l
5	ml	Nichtessentielle Aminosäuren (NEA)
5	ml	Natrium-Pyruvat
5	ml	Penicillin/Streptomycin
2	ml	Ciprofloxacin
500	µl	Amphotericin B, 1mg/ml
500	µl	Gentamycin

2.10.2 Allgemeine Puffer

ELISA-Waschpuffer

400	ml	PBS (10x)
2	ml	Triton X-100
add 4000	ml	Aqua bidest.

ELISA-Blockier-Lösung, Assay Diluent

5	ml	FCS
45	ml	ELISA-Waschpuffer

IL-8 Coating Buffer

0,1	M	NaHCO_3 (pH=8,5)
-----	---	---------------------------

IL-6 Coating Buffer

0,1	M	Na_2CO_3
8,4	g	NaHCO_3
3,56	g	Na_2CO_3
add 1000	ml	Aqua bidest.

Laemmli-Puffer (2x)

2,5	ml	0,5M Tris (pH=6,8)
2	ml	Glycerin
4	ml	10% SDS
in 10	ml	dest. H ₂ O

RIPA-Puffer

5	ml	1 M Tris
3	ml	5 M NaCl
1	g	Deoxycholsäure
1	ml	Triton X – 100
500	µl	10% SDS
in 50	ml	dest. H ₂ O

Waschpuffer TBST für Western Blot

0,5	M	Tris
5	M	NaCl
1	ml	Tween 20
In		dest. H ₂ O

3 Methoden

3.1 Isolierung, Lagerung und Kultivierung von CLPF

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden an einer Sterilbank (Lamin Air, Heraeus) durchgeführt. Die CLPF wurden wie von Leeb et al. und Brennmoehl et al. beschrieben aus Biopsien und Resektaten isoliert.¹¹⁰

Dafür wurde die Mukosa in 1 mm große Stücke geschnitten, während die Biopsien direkt verwendet wurden. Die intestinalen Epithelzellen wurden in 10 ml Hanks' Balanced Salt Solution ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} und 2 mM 0,5 M EDTA bei 37°C für 20 Minuten durch Schütteln entfernt. Das verbliebene Gewebe wurde anschließend in 1 ml PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mit 1 mg/ml Kollagenase, 0,3 mg/ml DNase I und 2 mg/ml Hyaluronidase für 30 Minuten bei 37°C verdaut. Der Kollagenase-Verdau der isolierten Zellen wurde mit 10% FCS in Dulbecco's Modified Eagle's Medium abgestoppt. Durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 4500 rpm, 5 Minuten) und Resuspension wurden die isolierten Zellen gewaschen und anschließend in 5 ml sterilem FCS-haltigem Medium in einer 25 cm² Kulturflasche bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Nicht adhärente Zellen wurden durch Wechsel des Mediums entfernt. Sobald die Zellen konfluent gewachsen waren, wurden sie vom Flaschenboden abgelöst (ca. 1,5 ml 0,5% Trypsin in PBS), zentrifugiert (Megafuge, 1200 rpm, 10 Minuten, Raumtemperatur), in eine Petrischale (100 x 20 mm) überführt und in einem Inkubator weiterkultiviert. Das Medium wurde alle 4 Tage gewechselt bis die Zellen dicht genug gewachsen waren.^{111, 112}

Die CLPF wurden in Petrischalen ausgesät und bei 37°C, 10% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Heraeus, Hanau) kultiviert. Zweimal pro Woche wurde das Zellkulturmedium erneuert. Beim Erreichen von einer Konfluenz von über 95% wurden die Zellen 1:2 bzw. 1:3 gesplittet. Dieses wurde wie folgt durchgeführt. Die mit den adhären CLPF besetzten Petrischalen wurden mit 10 ml Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gespült und danach mit 1,5 ml 0,5% Trypsin (in PBS verdünnt) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die gelösten Zellen wurden mit 5 ml Zellkulturmedium mehrmals resuspendiert und in einem Falken-Tube für 10 Minuten

bei 1800 rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurde erneut mit Zellkulturmedium resuspendiert. Dieses dadurch entstandene CLPF-Konzentrat wurde auf neue sterile Petrischalen verteilt. Es wurde zu jeder Schale 10 ml Zellkulturmedium hinzugegeben und in den Brutschrank zur weiteren Kultivierung gestellt. Bis es zu einer erneuten Konfluenz von über 95% kam vergingen gewöhnlich zwei bis drei Wochen.

Patient	Therapie
ST 1	Infliximab
ST 2	keine Crohn spezifische Medikation
ST 3	Mesalazin, Prednisolon, Azathioprin
ST 4	keine Angaben (Resektat vom KH St. Josef)
MC 1	keine Crohn spezifische Medikation
MC 2	keine Crohn spezifische Medikation
MC 3	keine Angaben (Resektat vom KH St. Josef)

Abbildung 5: Verwendete CLPF von Morbus Crohn Patienten mit der jeweiligen medikamentösen Therapie der Patienten.

3.2 Stimulation der CLPF mit IL-22, TNF- α und LPS

Für diese Arbeit wurden drei verschiedene Gruppen von CLPF benötigt. Die Kontroll-Gruppe bestand aus Kontroll-CLPF, die aus der intestinalen Mukosa von Patienten isoliert wurden, bei denen keine chronisch entzündliche Darmerkrankung vorlag. Als zweite Gruppe wurden MC-CLPF aus dem Intestinum von Morbus Crohn Patienten, bei denen keine Stenose nachgewiesen werden konnte, isoliert. Als dritte Gruppe wurden ST-CLPF aus stenotischen Darmabschnitten von Morbus-Crohn-Patienten isoliert.

Die CLPF wurden in den Teilungsstadien drei bis sechs für Stimulationsversuche benutzt. Wie unter 3.1 beschrieben, wurden die CLPF mit Trypsin aus den Petrischalen gelöst, mit Zellkulturmedium resuspendiert, zentrifugiert, der Überstand verworfen und nochmals mit 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Nun wurden

100 µl dieser Zellsuspension in ein Well einer 96-Wellplatte überführt. Von der überführten Zellsuspension wurden 10 µl in ein neues Well überführt. Nun wurden 10 µl Trypanblau zu den 10 µl Zellsuspension gegeben. Von diesem Gemisch wurden wiederum 10 µl in eine Zellzählkammer überführt. Unter einem Lichtmikroskop wurde die Zellzahl mittels Zellzählkammer ermittelt. Dieses wurde auf das Gesamtvolumen der Zellsuspension hochgerechnet.

Die Versuche wurden in 12-Well-Platten durchgeführt. Es wurden 50.000 Zellen pro Well eingesetzt. Jeweils 1 ml Suspension wurde in ein Well gegeben. Nach 24 Stunden hatten sich die CLPF auf dem Boden des Wells festgesetzt. Nun wurde das Zellnährmedium abgesaugt und 2 ml Stimulationsmedium pro Well pipettiert. Nach weiteren 12 Stunden wurde der Stimulationsversuch begonnen.

Die Stimulations-Experimente wurden jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Verdünnungen wurden in Stimulationsmedium hergestellt. IL-22 wurde in den Konzentrationen 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml eingesetzt. Zwei verschiedene Positiv-Kontrollen wurden gleichzeitig eingesetzt, einmal 10 ng/ml LPS und einmal 1 ng/ml TNF. Als Negativ-Kontrolle wurden zweimal 2 ml Stimulationsmedium pro Well benutzt.

3.3 Western Blotting

Anhand des Western Blots ist es möglich, Proteine zu identifizieren. Zuerst werden die Proteine nach ihrer Molekülgröße in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Hierbei wird ein Komplex mit SDS (Natriumdodecylsulfat) geformt, das an die hydrophoben Bereiche des Proteins bindet und dessen eigentliche Ladung durch negative Ladungen maskiert. Auch die nichtkovalenten Wechselwirkungen werden aufgebrochen und damit das Protein entfaltet. Außerdem werden die intramolekularen Schwefelbrückenbildungen durch Mercaptoethanol zerstört und hiermit auch die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins. Durch die netzartige Struktur des Polyacrylamids im Gel, die wie ein Sieb wirkt, werden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Große Proteine wandern langsamer als kleine durch die Maschen des Polyacrylamids. Der

elektrophoretischen Auftrennung folgt das Blotten der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Dort werden die Proteine mit Antikörpern markiert und mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

Zytosolpräparation

Die adhärenenten Zellen wurden mit 1,5 ml 0,5% Trypsin (in PBS) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die gelösten Zellen wurden mit 5 ml Zellkulturmedium mehrmals resuspendiert und in einem Tube für 10 Minuten bei 1800 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 100 µl RIPA-Lyse-Puffer hinzugegeben. Dieses wurde für 30 Minuten bei 4°C gelagert. Danach wurde es bei 4°C und 13.000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde verworfen und das Lysat bei -20°C eingefroren.

Die Konzentration der im Überstand befindlichen Proteinfraction wurde mit dem BCA-Test ermittelt. Dabei wurden in eine 96-Mikrotiterplatte 10 µl Standard, der aus einer 2 mg/ml-BSA-Stock-Lösung hergestellt wurde, Proben und Blank in Doppelbestimmung pipettiert. Danach wurden 200 µl einer „working reagent“ hinzugegeben. Dieses „working reagent“ bestand aus 50 Teilen Bicinchonin Säure und einem Teil Kupfer(II)-Sulfat-Pentahydrat-4%-Lösung. Die fertig pipettierte Platte wurde nach 30 Sekunden langem Schütteln bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Danach wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm und 540 nm gemessen.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Probenpräparation

Die verschiedenen Proben wurden so mit H₂O auf 33,3 µl Gesamtvolumen aufgefüllt, dass sich in allen Spuren auf dem Gel die gleiche Proteinkonzentration befand. Es wurden noch 6,7 µl Laemmli-Puffer hinzugegeben, welches dann ein Endvolumen von 40 µl ergab. Dieses wurde dann für fünf bis zehn Minuten bei 95°C aufgekocht und nachfolgend zur Sedimentation des Kondenswassers für eine Minute bei 4°C und 13.000 rpm abzentrifugiert.

Durchführung der Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der denaturierten Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das XCell II™ Mini-Cell Modul (Novex-Kammer) verwendet. Der Probenkamm der Einmal-SDS-Polyacrylamid-Gelkassette (4% – 12%) wurde vorsichtig entfernt, die restliche Sammelgel-Lösung mit Aqua bidest. abgespült. Die Gelkassette wurde in die Novex-Kammer eingesetzt und diese anschließend mit Laufpuffer (1x) befüllt. Daraufhin wurden 40 µl der präparierten Proben in die jeweiligen Geltaschen pipettiert. Diese ließ man bei 160 -180 V (90 mA pro Gel) durch die Gelkassette wandern. Die Laufzeit betrug circa eineinhalb Stunden, bis die Laufmittelfront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Ein sogenannter „Marker“ wurde stets als Größenstandard für die zu detektierenden Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel mitgefahren.

Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran (Blotten)

Der Proteintransfer vom SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran erfolgte ebenfalls mit dem XCell II™ Mini-Cell Blot-Modul mittels Tank-Blotting-Technik. Hierfür wurde eine Sandwich-Anordnung aus Schwämmen, Whatman-Filterpapier, dem Polyacrylamid-Gel und der Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm) hergestellt. Das Polyacrylamid-Gel wurde nach dem Aufbrechen aus der Einmal-Gelkassette entnommen, mit einem Skalpell das Sammelgel abgeschnitten und auf die Größe des Whatman-Filterpapiers zurechtgeschnitten. Auf die Kathodenseite des Blot-Moduls wurden zwei mit Transferpuffer getränkte Schwämme gelegt. Darauf folgte eine Lage Whatman-Filterpapier, das mit den aufgetrennten Proteinen beladene Polyacrylamid-Gel, die Membran, eine weiteren Lage Filterpapier und zwei weitere in Transferpuffer getränkte Schwämme. Beim Aufbau wurde darauf geachtet, dass sich zwischen den einzelnen Schichten keine Luftblasen befanden, da sonst nur ein unvollständiger Transfer zu beobachten gewesen wäre. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei 300 V und 220 mA für die Dauer von circa eineinhalb Stunden.

Immundetektion der Proteine

Zur Immundetektion der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran, auf der sich jetzt die aufgetrennten Proteine befanden, über Nacht bei 4°C in Blockierlösung (je nach

Antikörper: 5%ige Magermilchlösung oder 5%ige BSA-Lösung in Waschpuffer) geschwenkt. Dies führte zu einer Absättigung freier Bindungsstellen auf der Membran und auf diese Weise zu einer Reduktion unspezifischer Antigen-Antikörper-Reaktionen. Nachdem die Membran kurz in Waschpuffer gewaschen wurde, erfolgte eine mindestens einstündige Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit dem in Blockierlösung verdünnten Primärantikörper. Die Membran wurde daraufhin für 6 x 10 Minuten in Waschpuffer kräftig geschüttelt. Der gegen den Primärantikörper gerichtete, in Blockierlösung verdünnte Sekundärantikörper (HRP-gekoppelt) wurde dann für weitere 60 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Vor der Entwicklung mit dem ECL-Plus™ Western Blotting Detection Kit wurde die Membran für 6 x 10 Minuten in Waschpuffer kräftig geschüttelt, um eventuell noch anhaftende, nicht gebundene Antikörper restlos zu entfernen. Daraufhin wurden 3 ml des ECL-Plus™ Western Blotting Detection Kit auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Die noch mit Detektionslösung befeuchtete Membran wurde in Klarsichtfolie verpackt und mit der Proteinseite nach oben in eine Röntgenfilmkassette eingelegt. Im nächsten Schritt wurde bei Rotlicht in der Dunkelkammer ein Hyperfilm ECL™ für einen Zeitraum von 3 Sekunden bis 20 Minuten, je nach Intensität der Fluoreszenz des Antikörpers, aufgelegt. Anschließend wurde der Hyperfilm mit Hilfe der Western-Blot Entwicklermaschine entwickelt.

Stripping

Nach der Exposition mit einem spezifischen Antikörper konnten die gebundenen Antikörper von der verwendeten Nitrozellulosemembran mit Hilfe der Re-Blot Plus-Strong (20x)-Lösung entfernt werden. Dafür musste die Nitrozellulosemembran kurz mit TBST gewaschen und anschließend für 15 Minuten mit 10 ml Re-Blot-Plus-Strong-(20x)-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nun wurde die Nitrozellulosemembran für 2 x 5 Minuten gewaschen. Nachfolgend wurden die freigebliebenen unspezifischen Bindungen wieder in Blockierlösung für eine Stunde gesättigt bevor die Membran für eine weitere Antikörperinkubation genutzt werden konnte.

3.4 ELISA

Prinzip

Mittels dem „enzyme linked immuno sorbent assay“ (ELISA) kann die Konzentration von Zytokinen in einer Probe bestimmt werden. Es handelt sich dabei um einen sogenannten Sandwich-ELISA. Zur Durchführung werden 96-Well-Platten mit einem spezifischen Antikörper für das zu untersuchende Zytokin beschichtet. Ungesättigte Bindungsstellen werden mit einer serumalbuminhaltigen Lösung abgesättigt. Danach wird die zu untersuchende Probe hinzugefügt. Anschließend wird ein für das Antigen spezifischer biotinylierter Antikörper zugegeben. An das biotinylierte Ende des Antikörpers kann nun peroxidase-gekoppeltes Streptavidin mit hoher Affinität binden. Nun wird Tetramethylbenzidin zugegeben, das durch die Peroxidase zu einem Farbstoff umgewandelt wird. Die Absorption dieses Farbstoffs kann bei einer spezifischen Wellenlänge photometrisch bestimmt werden. Die Zytokinkonzentrationen können dann mit Hilfe von Standardproben des jeweiligen Zytokins in bekannter Konzentration ermittelt werden. (Abbildung 6)

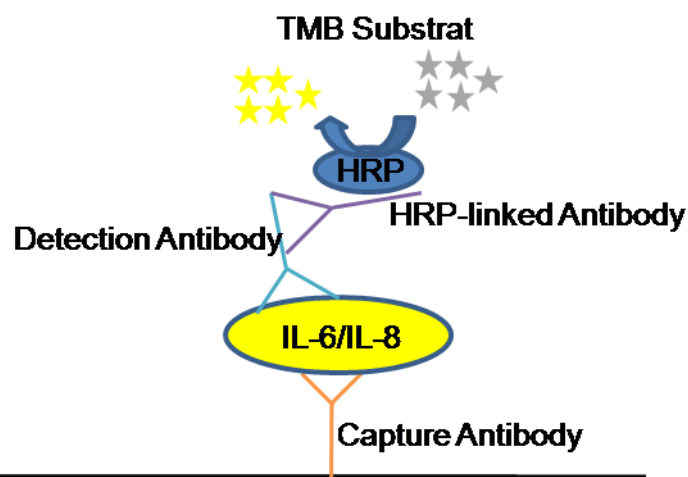


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Sandwich-ELISA.

Durchführung

Zuerst wurde der Coating-Antikörper 1:250 mit NaHCO_3 (pH=8,5) verdünnt. Danach wurden 50 μl Coating-Antikörper-Lösung pro Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der Platte mit dem

ELISA-Waschpuffer wurde mit 100 µl Assay-Diluent pro Well blockiert. Dieses wurde für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde wieder gewaschen und 50 µl Standard, Blank und Probe pro Well, jeweils in Doppelbestimmung, pipettiert. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur und nachfolgendem ausgiebigem Waschen der Platte wurden 50 µl einer 1:250-Verdünnung des Detektions-Antikörpers und einer 1:250-Verdünnung der Meerrettichperoxidase in jedes Well pipettiert. Dieses wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligen Waschen der Platte wurden 50 µl TMB Substrate Reagent Set pro Well hinzugegeben. Dieses wurde für 30 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden jeweils 25 µl H₂SO₄ hinzupipettiert. Danach wurde mittels des ELISA-Readers bei zwei Wellenlängen von 450 nm und 570 nm die optische Extinktion und damit die Konzentration von IL-8 bzw. IL-6 ermittelt.

3.5 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurden am Ende des Stimulationsversuches nach der Abnahme der gesamten Überstände 350 µl RLT lysis buffer (+ 1% β-Mercaptoethanol) in jedes Well pipettiert. Nach kurzem Schwenken wurde das nun in den Wells befindliche RNA-Lysat in Eppendorf-Cups überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren.

Gemäß der Anleitung vom RNeasy MiniKit (Quiagen) wurde zu dem RNA-Lysat 70% Ethanol hinzugegeben und mit der Pipette durchgemischt. Das Gesamtvolumen von 700 µl wurde zum Übergang in die Spincolumn pipettiert und eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde. Nun wurde die RNA, die sich nun im Filter der Spincolumn befand, mit 350 µl RW1 wash buffer gewaschen und wieder bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte der Übergang in das RNase free DNase Set. Dazu wurde ein Ansatz aus 10 µl DNase I und 70 µl RDD-Puffer direkt auf den Filter gegeben, für 15 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 15 Sekunden bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Es wurden 350 µl RW1 wash buffer erneut auf das Spincolumn pipettiert und für eine Minute wieder bei 13.000 rpm

abzentrifugiert. Das Spincolumn wurde auf ein neues 2 ml Collectiontube gesetzt und zweimal hintereinander mit 500 µl RPE wash buffer (55 ml concentrate + 220 ml Ethanol) gewaschen. Beim zweiten Mal wurde 3 Minuten zentrifugiert, damit die Säule richtig trocken wurde. Zum Eluieren der RNA wurde das RNA enthaltende Spincolumn auf ein 1,5 ml Eppendorf-Cup gesetzt, 40 µl RNase freies Wasser, damit die RNA nicht gespalten wird, auf den Filter pipettiert und eine Minute bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Das Eluat im Eppendorf-Cup wurde erneut auf den Filter gegeben, nochmals abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

3.6 Reverse Transkriptase

Die reverse Transkription (RT) ist der erste Schritt bei der Untersuchung der Genexpression mittels Taqman-PCR Technik. Dabei wird die isolierte RNA mit einer „Reversen Transkriptase“ in ihre komplementäre DNA-Sequenz (cDNA) konvertiert.

Durchführung

Ein typischer Mastermix-Ansatz für eine Probe sah folgendermaßen aus:

Random Primer	3	µl
10x Puffer	2	µl
dNTP mix	0,8	µl
RNase Inhibitor	0,5	µl
Reverse Transkriptase	1	µl

In einem 20 µl Ansatz wurden 1000 ng RNA in maximal 12,7 µl umgeschrieben. Fehlendes Volumen wurde mit RNase free Water aufgefüllt. Zur RNA wurden 7,3 µl Mastermix hinzugegeben und zur Umwandlung in cDNA im Thermocycler für 10 Minuten bei 25°C, 15 Minuten bei 42°C, 5 Minuten bei 95° und 4°C pausiert. Die dabei entstandene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.7 Taqman-PCR

Die cDNA, die das Resultat der Reversen Transkriptase Reaktion ist, wird in diesem Schritt als Vorlage (Schablone) für die Amplifikation der DNA genutzt. Die Real-Time-PCR mittels Taqman beruht auf einer Messung emittierter Fluoreszenz als Indikator für gebildete Amplifikate während der exponentiellen Phase der Polymerase-Ketten-Reaktion. Das Signal steigt proportional zu der Menge gebildeter PCR-Produkte. Der Thermocycler des Taqman-Gerätes ist mit einer sensitiven Kamera ausgestattet, die die Fluoreszenz in jedem der 384-wells der Messplatte während der PCR bestimmt. Für die Durchführung der Messung werden speziell gewählte Primer benötigt, sowie

fluoreszierende Sonden, bei denen es sich um Oligonukleotide handelt. Diese sind länger als Primer (20-30 Basenpaare lang) und bestehen am 5' Ende aus einem fluoreszierenden Farbstoff, sowie einem dämpfenden Farbstoff am 3' Ende. Sie sind so gestaltet, dass sie an interne Regionen der PCR-Produkte binden. Wenn die Taq-Polymerase ein Template, an dem eine hydrolysierende Sonde gebunden ist, repliziert, spaltet die 5' Exonuklease das 5' Ende mitsamt des Farbstoffs. Durch die Spaltung wird der fluoreszierende Teil der Sonde vom dämpfenden Teil isoliert. Die Menge der durch diesen Prozess emittierten Fluoreszenz steigt proportional zur Menge gespaltener Sonden. Während der nicht hybridisierenden Phasen der PCR verhindert die Nähe des fluoreszierenden Farbstoffs zu dem dämpfenden Farbstoff eine Fluoreszenz-Emission.

Kalkulation der relativen Expressionsänderung der Gene unter Stimulation mit Zytokinen mittels der Comparativen Ct-Methode (basierend auf den PCR-Ergebnissen)

Die Berechnung des Wertes Ct basiert auf der Bestimmung des Zeitpunktes (gemessen wird die Anzahl bereits durchlaufender PCR-Zyklen), an dem die Menge der emittierten Fluoreszenz einer Probe über einen, für das Gerät definierten, Schwellenwert ansteigt. Dieser Schwellenwert ergibt sich aus der Hintergrundfluoreszenz des Gerätes. Somit stellt der Ct Wert ein direktes Maß für die Anzahl gebildeter DNA-Amplifikate dar. Der Ct Wert korreliert mit der eingesetzten cDNA Menge, ein höherer Wert derselben führt dementsprechend zu einem niedrigeren Schwellenwert. Der Ct Wert einer jeden Probe stellt keine absolute Kopieanzahl dar, sondern ist ein relativer Wert, stets normalisiert durch den Wert eines internen Standards. Hierbei handelt es sich um GAPDH, ein sogenanntes „Housekeeping“-Gen, welches ubiquitär homogen exprimiert wird. Die Methode beruht auf einem Vergleich der Ct Werte der behandelten Probe mit den Ct Werten der unbehandelten Probe. Der relative Expressionsunterschied einer Probe (stimulierte versus unstimulierte), bezeichnet als Ratio der Probe, ergibt sich aus folgender Formel.

$$\text{Fold-induction} = 2^{-[\Delta Ct]}$$

Dabei ermittelt

$Ct = [(Ct_{GI(stimuliert\ Probe)}) - (Ct_{GAPDH})] - [Ct_{GI(unstimulierte\ Probe)} - (Ct_{GAPDH})]$ die Hochregulation sowie

$Ct = [(Ct_{GI(unstimulierte\ Probe)}) - (Ct_{GAPDH})] - [Ct_{GI(stimulierte\ Probe)} - (Ct_{GAPDH})]$ die Runterregulation

der Expression eines Gens. GI bezeichnet das gene of interest. In diesem Fall Collagen I und CTGF. Eine Hochregulation bedeutet eine Steigerung der Expression eines Gens unter Stimulation. Dies ist eine relative Angabe zu der Expression des gleichen Gens einer unstimulierten Probe. Eine Runterregulation bezeichnet dementsprechend eine Senkung der Expression eines Gens unter Stimulation, wiederum relativ zu der Expression des gleichen Gens ohne Stimulation zu betrachten.

Die Formel beruht auf der Annahme, dass die Änderung des Zusammenhangs zwischen Ct Wert und dem Wert neu gebildeter Amplifikate für das Zielgen und das „Housekeeping“- Gen identisch sind. Das also eine Verdopplung der Ziel cDNA zu einem Ct Abfall um den Wert eines Zyklus führt.

Aus den Ergebnissen wurde mathematisch die Ratio erstellt und die Mittelwerte sowie der standard error of mean berechnet. Zur grafischen Verlaufsdarstellung wurden die Mittelwerte konstanten Geraden der Hoch- bzw. Runterregulation zugeordnet.

Durchführung

1. Bindung von Sonde und Primern an die cDNA
2. Hydrolyse der Sonde durch die Taq-Polymerase
3. Abdissoziieren der Sonde
4. Aktivierung der Fluoreszenz

Für die Taqman-PCR wurden 384-Well-Platten benutzt. Jede Probe wurde im Triplet gemessen. Zuerst wurde der Mastermix für ein spezifisches zu messendes Zielgen (Kollagen I, CTGF) wie folgt zusammenpipettiert. Pro Probe wurden 35 µl QPCR - Mastermix, 0,5 µl (128 nmol) forward Primer, 0,5 µl (128 nmol) reverse Primer, 5 µl (357 nmol) Sonde und 3,5 µl GAPDH-Mix (100 nmol Primer + 200 nmol Sonde) zusammenpipettiert. Von diesem Mastermix wurden jeweils 44,5 µl zu 3,5 µl cDNA + 22 µl H₂O hinzugegeben, welches 70 µl insgesamt pro Probe ergab und anschließend gevortext. Diese Mastermix-cDNA-Mischungen wurden dann zur dreifach-Bestimmung dreimal je 20 µl pro Well pipettiert. Die fertig pipettierte 384-Well-Platte wurde noch einmal abzentrifugiert und in das Sequence Detection System gestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung humaner CLPF auf deren IL-22-Rezeptor Status

Eine Voraussetzung für die Untersuchung möglicher Effekte von IL-22 auf die Zytokin- und Fibroseaktivität von CLPF war der Nachweis des IL-22 Rezeptors, der sich aus dem IL-22RA1 und dem IL-10R2 zusammensetzt. Nach der Isolation der Gesamtproteine aus den CLPF wurde der Nachweis mittels Western Blot durchgeführt. Zuerst wurde der Antikörper gegen die Untereinheit IL-22RA1 auf die Membran gegeben. Nachfolgend wurde die Membran gestrippt und diesmal mit dem Antikörper gegen die IL-10R2-Untereinheit inkubiert. Es konnten beide IL-22-Rezeptorkomponenten auf der Oberfläche der Kontroll-CLPF und Morbus Crohn-CLPF nachgewiesen werden. Als Positiv-Kontrolle wurden intestinale Gesamtbiospien verwendet, da bekannt ist, dass intestinale Epithelzellen beide Untereinheiten besitzen. (Abbildung 7)

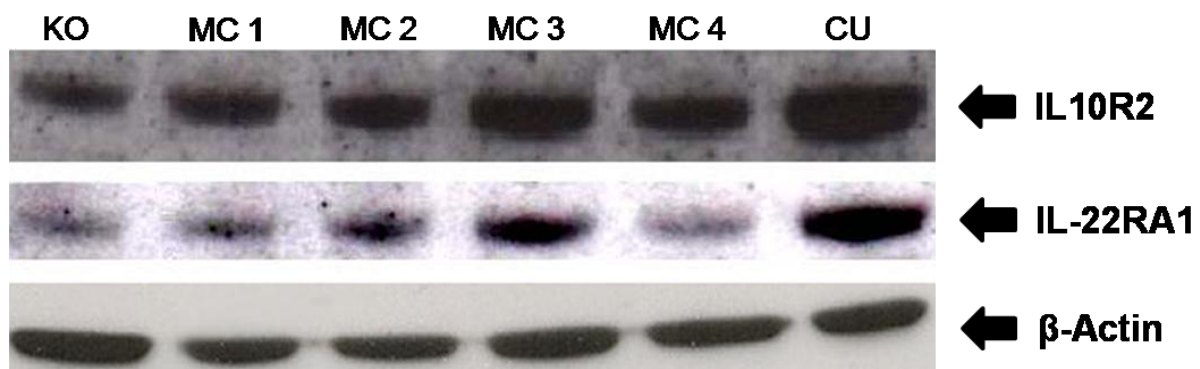


Abbildung 7: **Nachweis der beiden IL-22-Rezeptor-Untereinheiten IL10R2 und IL-22RA1**

KO= Kontrolle, MC= Morbus Crohn, CU= Colitis Ulcerosa

Damit ist die Voraussetzung für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Effekte von IL-22 auf die Zytokinproduktion und Induktion von Fibrosemarkern bei den CLPF, die aus nicht entzündlichem Darm (Kontrolle) und Morbus Crohn Patienten isoliert wurden, gegeben.

4.2 Der Einfluss von IL-22 auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine bei CLPF

4.2.1 Untersuchungen zum Dosis-Wirkungseffekt

Um die Auswirkung von IL-22 auf die Produktion von Entzündungsmediatoren durch CLPF zu beurteilen, wurde der Effekt unterschiedlicher Konzentrationen von IL-22 auf die IL-6- und IL-8-Sekretion untersucht. Nach zwölf und 24 Stunden Stimulation mit IL-22 wurden die Konzentrationen von IL-6 und IL-8 in den Überständen per ELISA gemessen.

4.2.1.1 Untersuchungen an CLPF aus nicht entzündlichen Kontrollen (KO-CLPF)

Die Kontroll-CLPF wurden mit IL-22 in sechs verschiedenen Konzentrationen (1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml) stimuliert. Als Positiv-Kontrolle wurden die CLPF mit LPS stimuliert. Nach zwölf Stunden wurden Überstände abgenommen und die IL-6- und IL-8-Konzentrationen per ELISA gemessen. Die Induktion der IL-6-Produktion war am stärksten bei einer IL-22-Konzentration zwischen 10 ng/ml und 100 ng/ml zu erkennen. Es kam zu einer durchgehend signifikanten ($p < 0,005$) Stimulation der IL-6-Produktion. Die deutlichste Steigerung der IL-6-Produktion nach zwölf Stunden zeigte sich bei einer Stimulation mit 10 ng/ml IL-22. (Abbildung 8A)

Nach 24 Stunden kam es zu einer hoch signifikanten Steigerung der IL-6-Produktion bei Einsatz von IL-22 in Konzentrationen von 1 ng/ml bis 100 ng/ml. Auch hier kam es bei 10 ng/ml zu der deutlichsten Steigerung der IL-6-Konzentration. (Abbildung 8B)

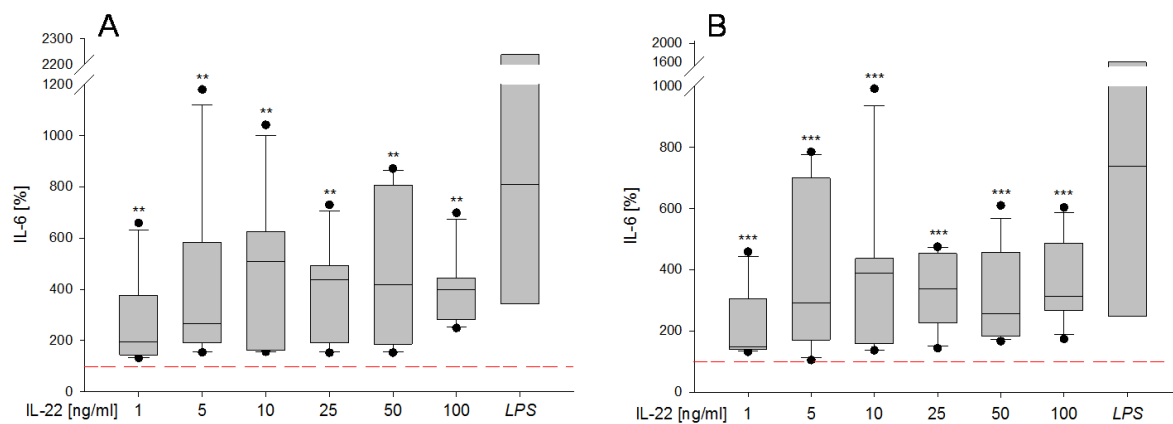


Abbildung 8: Anstieg der IL-6 Sekretion nach IL-22 Inkubation bei humanen CLPF

Stimulation von Kontroll-CLPF mit IL-22 sowie LPS nach (A) zwölf Stunden und nach (B) 24 Stunden Inkubation. Die y-Werte beziehen sich prozentual auf die IL-6-Konzentration der unstimulierten Kontrolle, die auf 100%-Punkte gesetzt wurde (rote gestrichelte Linie). Auf der x-Achse sind die IL-22-Konzentrationen in ng/ml und LPS als Positiv-Kontrolle angegeben. A: n= 6, **p<0,005 im Vergleich zu unstimuliert. B: n=8, ***p<0,001 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Die Überstände wurden auch auf die IL-8-Produktion hin untersucht. Es fand sich nach zwölf Stunden eine dosisabhängige Steigerung der IL-8-Produktion bei den Kontroll-CLPF. Hierbei kam es bei 5 ng/ml, 25 ng/ml und 100 ng/ml IL-22 auch zu einer signifikanten ($p<0,005$) Steigerung. (Abbildung 9A)

Nach 24 Stunden wurde die IL-8-Produktion durch IL-22 auch gesteigert. Es kam in den Konzentrationen von 1 ng/ml und 5 ng/ml zu einer signifikanten und bei 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml IL-22 zu einer hoch signifikanten Steigerung der IL-8-Produktion. (Abbildung 9B)

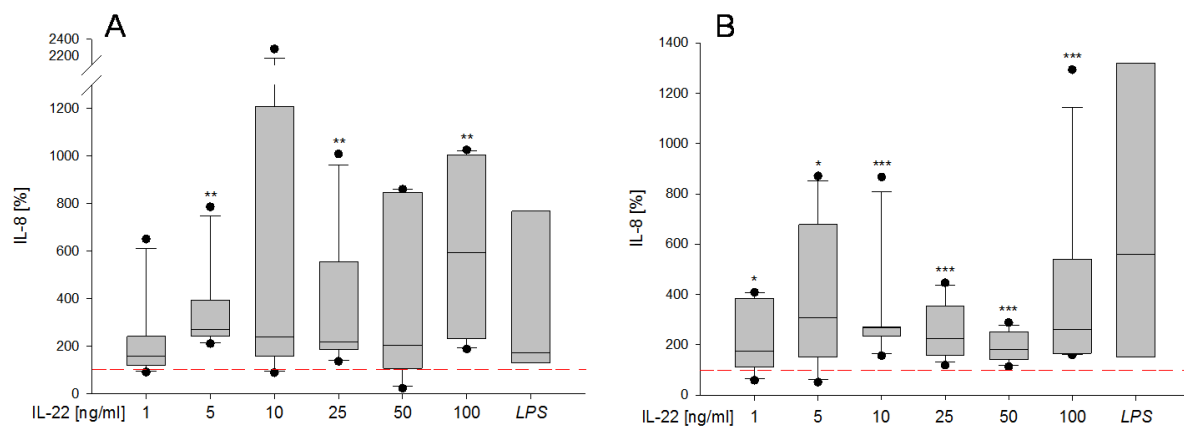


Abbildung 9: **Anstieg der IL-8 Sekretion nach IL-22 Inkubation bei humanen Kontroll-CLPF**

Stimulation von Kontroll-CLPF mit IL-22 nach (A) zwölf Stunden und nach (B) 24 Stunden Inkubation. Auf der y-Achse ist die IL-8-Produktion in Prozent aufgetragen. Die unstimulierte Kontrolle wurde auf 100%-Punkte gesetzt (rote gestrichelte Linie). Auf der x-Achse sind die IL-22-Konzentrationen in ng/ml und LPS als Positiv-Kontrolle angegeben. A: n=6, **p<0,005 im Vergleich zu unstimuliert B: n=6, *p<0,05; ***p<0,001 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

4.2.1.2 Untersuchungen an CLPF aus stenosefreien Darmabschnitten von Morbus-Crohn-Patienten (MC-CLPF)

CLPF von Morbus Crohn Patienten, die noch keine Stenose entwickelt hatten (MC), wurden mit den gleichen IL-22-Konzentrationen wie die Kontroll-CLPF stimuliert. Auch hier wurden nach zwölf und 24 Stunden Überstände abgenommen und die IL-6- und IL-8-Konzentrationen gemessen. CLPF von drei unterschiedlichen Patienten wurden für die Versuche verwendet (MC 1, MC 2, MC 3).

Nach zwölf Stunden kam es bei den IL-22-Konzentrationen unter 100 ng/ml bei MC 1 und MC 2 zu einem nicht eindeutigen Effekt auf die IL-6-Produktion. MC 3 CLPF reagierten bei allen IL-22-Konzentrationen (1 ng/ml bis 100 ng/ml) mit einer deutlichen Stimulation der IL-6-Produktion. Bei einer Konzentration von 100 ng/ml IL-22 kam es nach zwölf Stunden zu einem durchgehend stimulierenden Effekt auf die IL-6-Produktion bei den CLPF aller drei Patienten.

Werden die CLPF aller drei Patienten insgesamt aufgetragen, zeigt sich eine signifikante Stimulation der IL-6-Produktion bei einer Konzentration von 100 ng/ml IL-22. (Abbildung 10A)

Nach 24 Stunden kam es bei MC 3 CLPF zu einer deutlichen Stimulation der IL-6-Produktion bei allen IL-22-Konzentrationen. Bei MC 2 kam es zu einer Stimulierung der IL-6-Produktion ab einer IL-22 Konzentration von 10 ng/ml. Die IL-6-Produktion von MC 1 änderte sich nicht signifikant.

Wenn man auch hier wieder die Reaktion der Zellen auf die IL-22-Gabe zusammenfasst, zeigte sich bei über 10 ng/ml IL-22 eine dosisabhängige Steigerung der IL-6-Produktion. (Abbildung 10B)

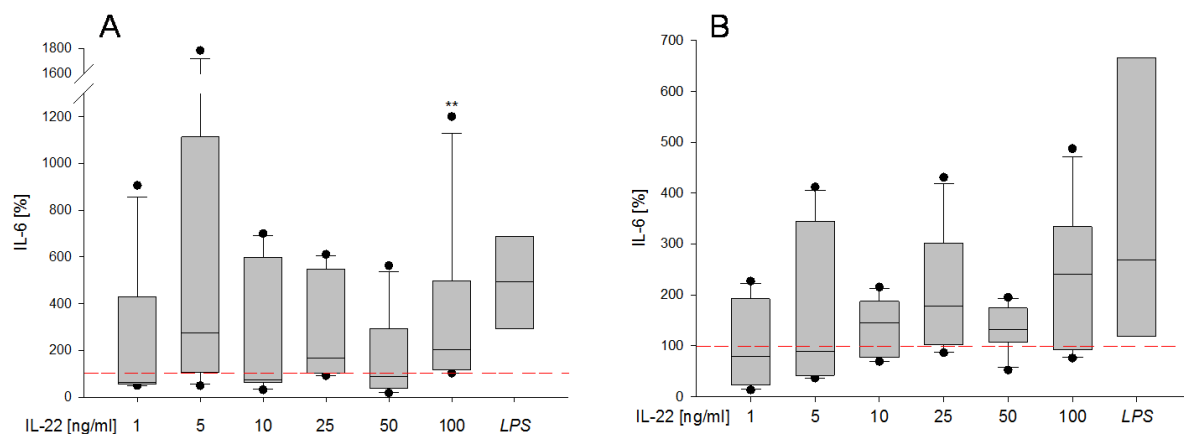


Abbildung 10: **Leichter Anstieg der IL-6-Sekretion bei Stimulation von MC-CLPF mit IL-22** nach (A) zwölf Stunden und nach (B) 24 Stunden. Auf der y-Achse ist die IL-6-Produktion in Prozent aufgetragen. Der unstimuliert-Wert ist auf 100 Prozent gesetzt (rote gestrichelte Linie). Auf der x-Achse sind die Konzentrationen von IL-22 in ng/ml und LPS als Positiv-Kontrolle angegeben. n=6, **p<0,005 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Bei der IL-8-Produktion wurde ein stimulierender Effekt nach zwölf Stunden ab einer Konzentration von 5 ng/ml IL-22 beobachtet. Keinen Effekt auf die IL-8-Produktion besaß IL-22 bei einer eingesetzten Konzentration von 1 ng/ml. Die Steigerung der IL-8-Produktion durch IL-22 war dosisabhängig. Bei den IL-22-Konzentrationen von 5 ng/ml und 25 ng/ml war die Steigerung sogar signifikant ($p<0,005$). (Abbildung 11A)

Die IL-8-Produktion ließ sich durch IL-22 in den Konzentrationen von 1 ng/ml und 5 ng/ml nach 24 Stunden signifikant steigern. Es kam auch in den höheren

Konzentrationen von IL-22 zu einer Steigerung der IL-8-Produktion, die jedoch nicht signifikant war. Auch hier zeigte sich eine Dosisabhängigkeit. (Abbildung 11B)

MC 1 CLPF zeigten kaum eine Änderung der IL-8-Produktion nach 24 Stunden, wobei MC 2 und MC 3 CLPF mit einer deutlichen Stimulierung der IL-8-Produktion reagierten.

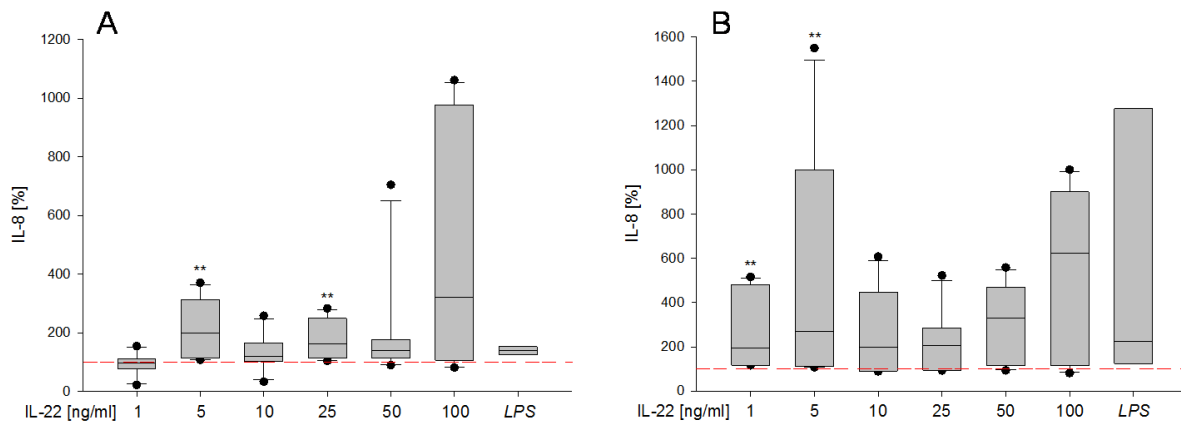


Abbildung 11: **Anstieg der IL-8-Sekretion bei Stimulation von MC-CLPF mit IL-22** nach (A) zwölf Stunden und nach (B) 24 Stunden. Auf der y-Achse ist die IL-8-Produktion in Prozent aufgetragen. Die unstimulierte Kontrolle wurde auf 100%-Punkte gesetzt (rote gestrichelte Linie). Auf der x-Achse sind die IL-22-Konzentrationen in ng/ml und LPS als Positiv-Kontrolle angegeben. n=6, **p<0,005 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

4.2.1.3 Untersuchungen an CLPF aus stenosierten Darmabschnitten von Morbus-Crohn-Patienten (ST-CLPF)

Auch CLPF, die aus stenosierten Darmabschnitten von Morbus-Crohn-Patienten (ST) isoliert wurden, wurden mit IL-22 stimuliert. Nach zwölf und 24 Stunden wurden Überstände abgenommen und deren IL-6- und IL-8-Konzentrationen gemessen. Es kam zu einer signifikanten Stimulation der IL-6-Produktion bei Stimulation mit IL-22 im Konzentrationsbereich von 1 ng/ml bis 50 ng/ml. Bei 100 ng/ml kam es zwar noch zu einer Steigerung der IL-6-Produktion, diese war allerdings nicht signifikant. (Abbildung 12A)

Nach 24 Stunden zeigte sich bei den CLPF des Patienten ST 1 eine Reduktion jedoch bei CLPF des Patienten ST 2 eine deutliche Steigerung der IL-6-Produktion durch IL-22.

Bei der Zusammenfassung der Reaktionen der CLPF beider Patienten (ST 1 und ST 2) zeigte sich bezüglich der IL-6-Produktion eine signifikante Steigerung bei der Gabe von 50 ng/ml und 100 ng/ml IL-22. Unterhalb von 50 ng/ml IL-22 kam es zu keinem eindeutigen Effekt auf die IL-6-Produktion. (Abbildung 12B)

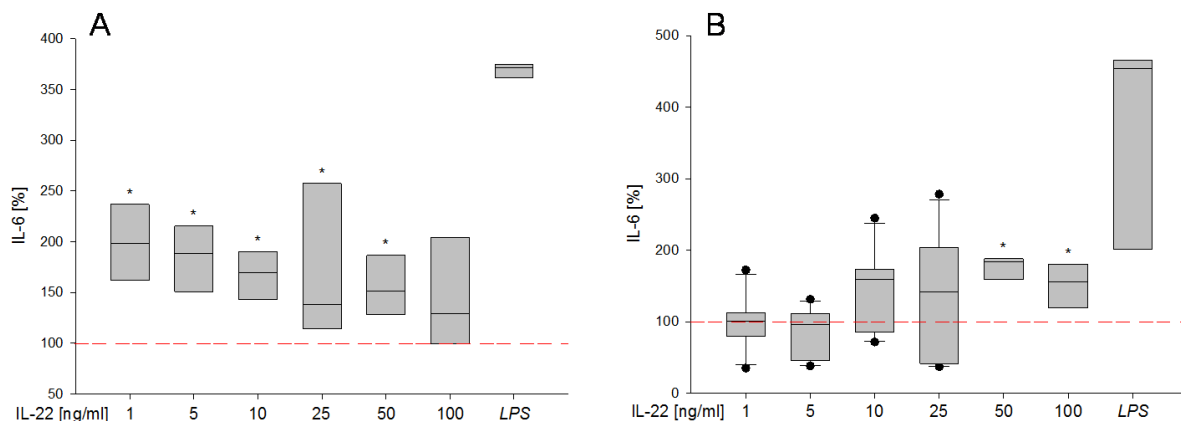


Abbildung 12: **Schwache IL-6-Produktionssteigerung bei ST-CLPF** (A) zwölf Stunden und (B) 24 Stunden nach Stimulation mit IL-22. Auf der y-Achse ist die IL-6-Produktion in Prozent aufgetragen. Die unstimulierte Kontrolle wurde auf 100%-Punkte gesetzt (rote gestrichelte Linie). Auf der x-Achse sind die IL-22-Konzentrationen in ng/ml und LPS als Positiv-Kontrolle angegeben. A: n=4 *p<0,05 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. B: n=6, *p<0,05 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Nach zwölf Stunden wurde die IL-8-Produktion bei der Stimulation mit IL-22 in den Konzentrationen von 1 ng/ml bis 100 ng/ml signifikant gesteigert. Hier zeigte sich auch bei höherer IL-22-Konzentration ein verminderter Effekt auf die IL-8-Produktion. (Abbildung 13A) Die Steigerung bei der IL-8-Produktion fiel prozentual deutlich höher aus als die IL-6-Produktion.

Bei Betrachtung der CLPF der verschiedenen Patienten zeigte sich nach 24 Stunden, dass es bei ST-1-CLPF keinen eindeutigen Effekt auf die IL-8-Produktion gab. Bei ST-2-CLPF zeigte sich eine deutliche Stimulierung und bei ST-4-CLPF eine Hemmung der IL-8-Produktion. Insgesamt betrachtet bewirkte IL-22 in allen Konzentrationen eine Steigerung der IL-8-Produktion nach 24 Stunden, die jedoch nicht signifikant war. (Abbildung 13B)

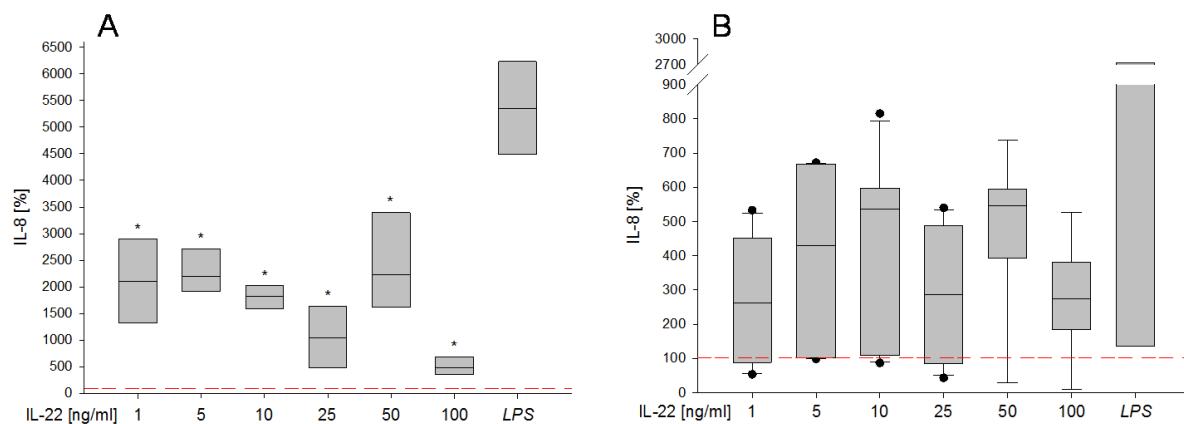


Abbildung 13: **Starke IL-8-Sekretionssteigerung bei ST-CLPF** nach (A) zwölf Stunden und weniger starke nach (B) 24 Stunden Stimulation mit IL-22. Auf der y-Achse ist die IL-8-Produktion in Prozent aufgetragen. Die unstimulierte Kontrolle wurde auf 100%-Punkte gesetzt (rote gestrichelte Linie). Auf der x-Achse sind die IL-22-Konzentrationen in ng/ml und LPS als Positiv-Kontrolle angegeben. n=6, *p<0,05 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

4.2.2 Stimulation der Kontroll-CLPF mit IL-22 und LPS

Da bei der chronischen intestinalen Entzündung bakterielle Bestandteile wie LPS zusammen mit Zytokinen, wie IL-22 mit CLPF in Kontakt kommen und diese beeinflussen könnten, wurde untersucht, welche Effekte eine Kostimulation mit LPS und IL-22 auf die Zytokinsekretion der Kontroll-CLPF hat.

Nach zwölf Stunden zeigte sich sowohl bei der IL-6- als auch bei der IL-8-Produktion eine Stimulation durch die gleichzeitige Gabe von 1 ng/ml bis 100 ng/ml IL-22 und jeweils 10 ng/ml LPS. Die maximale Steigerung der IL-6- und IL-8-Produktion war bei 100 ng/ml IL-22 + 10 ng/ml LPS zu beobachten. (Abbildung 14)

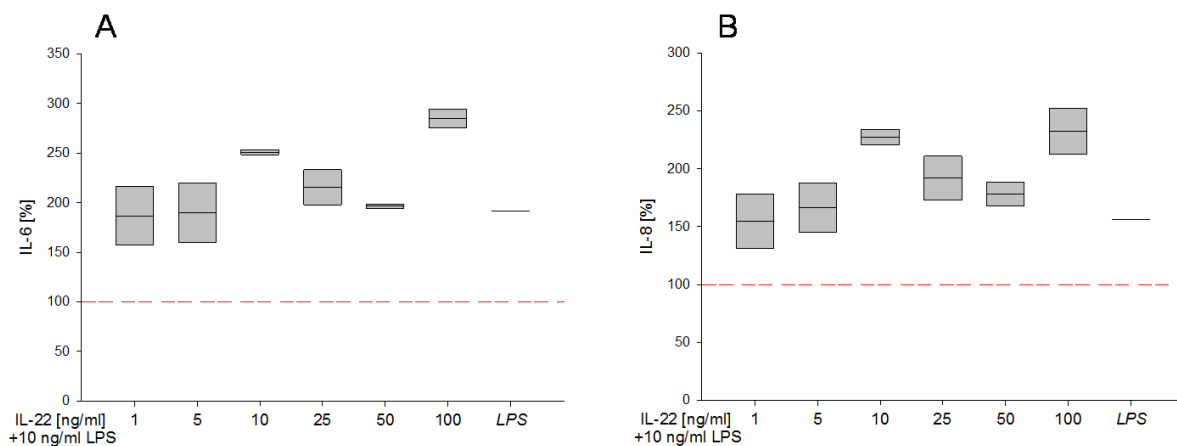


Abbildung 14: **Anstieg der (A) IL-6- und (B) IL-8-Sekretion zwölf Stunden nach Stimulation von Kontroll-CLPF mit IL-22 und jeweils 10 ng/ml LPS**. Auf der y-Achse ist die (A) IL-6-bzw. (B) IL-8-Produktion in Prozent aufgetragen. Die unstimulierte Kontrolle wurde auf 100%-Punkte gesetzt (rote gestrichelte Linie). Auf der x-Achse sind die IL-22-Konzentrationen in ng/ml und *LPS* als Positiv-Kontrolle angegeben. n=2

Auch nach 24 Stunden war eine Stimulation der IL-6- und IL-8-Produktion zu beobachten. Es war auch eine deutliche Dosisabhängigkeit sowohl bei der IL-6- als auch bei der IL-8-Produktion zu beobachten. Den stärksten Effekt bewirkte 100 ng/ml IL-22 + 10 ng/ml LPS. (Abbildung 15)

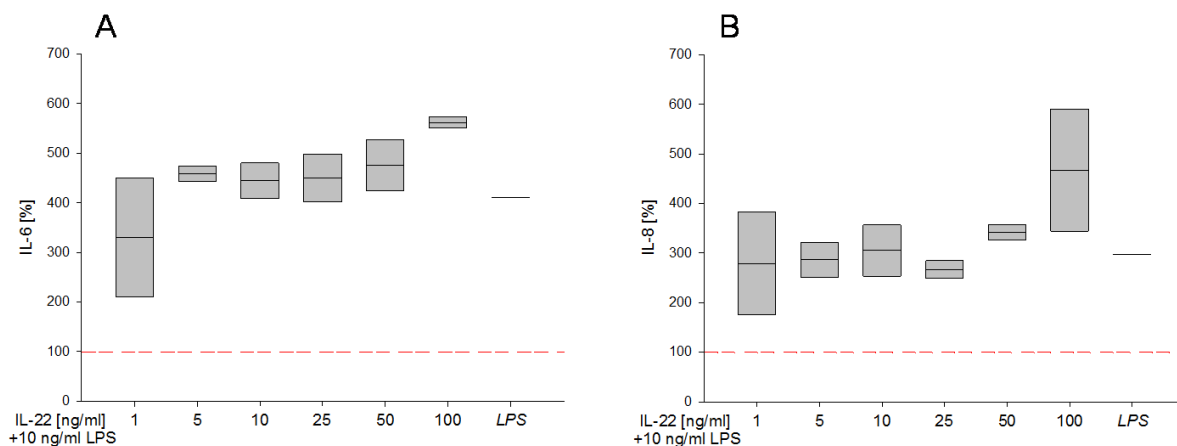


Abbildung 15: **Anstieg der (A) IL-6- und (B) IL-8-Sekretion 24 Stunden nach Stimulation von Kontroll-CLPF mit IL-22 und jeweils 10 ng/ml LPS**. Auf der y-Achse ist die (A) IL-6- bzw. (B) IL-8-Produktion in Prozent aufgetragen. Die unstimulierte Kontrolle wurde auf 100%-Punkte gesetzt (rote gestrichelte Linie). Auf der x-Achse sind die IL-22-Konzentrationen in ng/ml und *LPS* als Positiv-Kontrolle angegeben. n=2

4.2.3 Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

Der IL-22-Rezeptor konnte eindeutig sowohl auf den Kontroll-CLPF, auf den MC-CLPF als auch auf den ST-CLPF nachgewiesen werden. Auch war es möglich, die IL-6- und IL-8-Produktion der Kontroll-CLPF gleichermaßen mit IL-22 zu stimulieren. Die verschiedenen Kontroll-CLPF reagierten einheitlich auf die Gabe von IL-22. Auch die Kostimulation mit LPS und IL-22 zeigte eine Steigerung der IL-6- und IL-8-Sekretion, wobei sich nur bei höheren IL-22 Konzentrationen eine weitere Steigerung der Zytokinsekretion von LPS stimulierten CLPF erreichen ließ.

Im Gegensatz zu den Kontroll-CLPF reagierten die MC-CLPF bei der IL-8-Produktion stärker auf die IL-22-Gabe als bei der IL-6-Produktion. Auch ist die Steigerung der IL-6-Produktion nach 24 Stunden schwächer ausgebildet als nach zwölf Stunden.

Der Unterschied zwischen IL-8- und IL-6-Produktionssteigerung war bei ST-CLPF noch deutlich stärker ausgeprägt als bei MC-CLPF. Bei den ST-CLPF ist weiterhin auffällig, dass die IL-6- und auch die IL-8-Produktion nach 24 Stunden schwächer auf die IL-22-Gabe reagierten als nach zwölf Stunden.

4.2.4 Vergleich der IL-6- und IL-8-Produktion von Kontroll-, MC-, ST- und LPS-kostimulierten Kontroll-CLPF bei Stimulation mit 25 ng/ml IL-22

Am deutlichsten und stabilsten im Verlauf aller Versuche reagierten die CLPF bei einer Stimulation mit 25 ng/ml IL-22. Nachfolgend wird die Reaktion der IL-6- und IL-8-Produktion auf Stimulation mit 25 ng/ml IL-22 der drei CLPF-Gruppen (KO, MC, ST) und der LPS-kostimulierten Kontroll-CLPF im Vergleich dargestellt.

Nach zwölf Stunden Stimulation mit 25 ng/ml IL-22 war die größte Steigerung der IL-6-Produktion bei den Kontroll-CLPF zu sehen. Die MC-CLPF reagierten etwas schwächer. Die ST-CLPF reagierten noch weniger nach zwölf Stunden. Es war kein aussagekräftiger Unterschied der Produktionssteigerung bei den LPS-kostimulierten Kontroll-CLPF und den Kontroll-CLPF zu erkennen. (Abbildung 16A)

Bei der IL-8-Produktion zeigte sich ein anderes Bild. Hier reagierten die Kontroll-CLPF im Vergleich zu den MC-CLPF tendenziell stärker auf eine Stimulation mit IL-22, jedoch zeigten die ST-CLPF mit Abstand die stärkste IL-8-Produktionssteigerung gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Diese war im Vergleich zu den MC-CLPF auch signifikant ($p < 0,05$) stärker ausgeprägt. Auch hier war kein additiver Effekt einer LPS-Stimulation bei IL-22 stimulierten Kontroll-CLPF erkennbar. (Abbildung 16B)

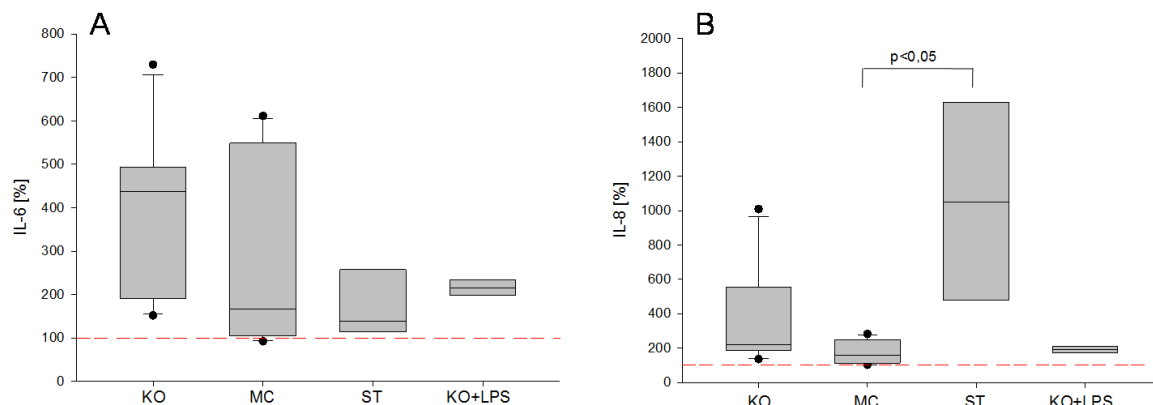


Abbildung 16: **ST-CLPF zeigen die geringste (A) IL-6- aber die stärkste (B) IL-8-Produktions-Steigerung bei Stimulation mit 25 ng/ml IL-22 nach zwölf Stunden.** Auf der x-Achse sind die Kontroll-, MC-, ST- und die LPS-kostimulierten Kontroll-CLPF aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die (A) IL-6 bzw. (B) IL-8-Produktion aufgetragen.

Nach 24 Stunden war die IL-6-Produktion der ST-CLPF signifikant schwächer ($p < 0,05$) als die der Kontroll-CLPF bei einer Stimulation mit 25 ng/ml IL-22. Die IL-6 Konzentration bei MC-CLPF lag bei der prozentualen IL-6-Produktions-Steigerung nach 24 Stunden zwischen den der Kontroll- und den ST-CLPF. Die LPS-kostimulierten Kontroll-CLPF steigerten ihre IL-6-Produktion deutlich stärker als die MC- und ST-CLPF jedoch war auch hierbei kein signifikanter Unterschied zu den Kontroll-CLPF zu erkennen. (Abbildung 17A)

Nach 24 Stunden reagierten die Stenose-CLPF bei der IL-8-Produktion am stärksten auf die Stimulation mit 25 ng/ml IL-22. Die MC-CLPF reagierten am schwächsten auf eine Stimulation mit IL-22 und die Kontroll-CLPF lagen zwischen den ST- und den MC-CLPF. Es konnte kein Unterschied der IL-8-Produktionssteigerung zwischen den Kontroll-CLPF und den LPS-kostimulierten Kontroll-CLPF beobachtet werden. (Abbildung 17B)

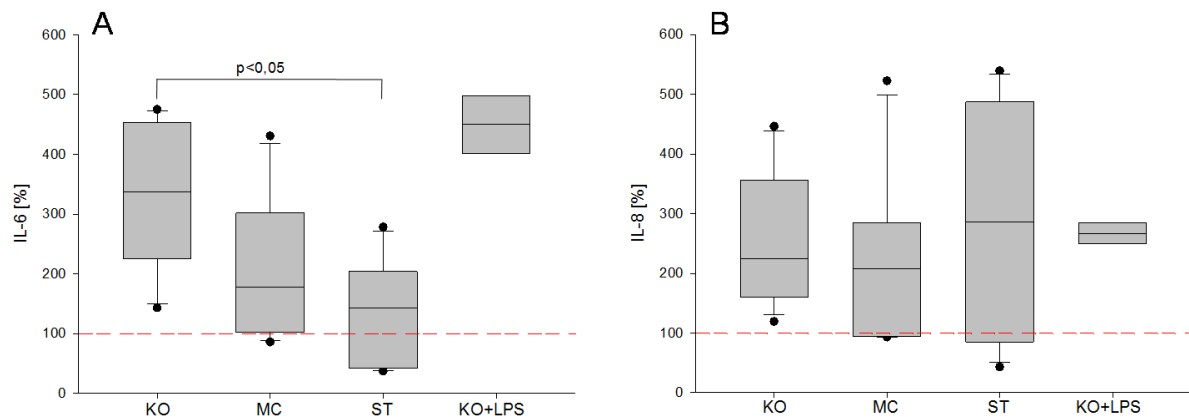


Abbildung 17: **ST-CLPF zeigen die geringste (A) IL-6- aber die stärkste (B) IL-8-Produktions-Steigerung bei Stimulation mit 25 ng/ml IL-22 nach 24 Stunden.** Auf der x-Achse sind die Kontroll-, MC-, ST- und die LPS-kostimulierten Kontroll-CLPF aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die (A) IL-6 bzw. (B) IL-8-Produktion aufgetragen.

4.2.5 Zeitlicher Verlauf der IL-6- und IL-8-Antwort bei Kontroll-CLPF

4.2.5.1 Zeitlicher Verlauf bis acht Stunden

Zur Beurteilung des zeitlichen Verlaufs der IL-6-Antwort wurden Kontroll-CLPF mit IL-22 stimuliert und die Überstände nach 30 Minuten, einer, zwei, vier und acht Stunden abgenommen. Nach zwei Stunden war eine leichte Steigerung der IL-6-Produktion gegenüber der unstimulierten Kontrolle nachweisbar, die nach acht Stunden am stärksten war. (Abbildung 18A)

Bei der IL-8-Produktion zeigte sich bei den ersten beiden Versuchen in einem Zeitraum von 30 Minuten bis acht Stunden, dass es zu der stärksten IL-8-Produktion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nach zwei Stunden kam. (Abbildung 18B)

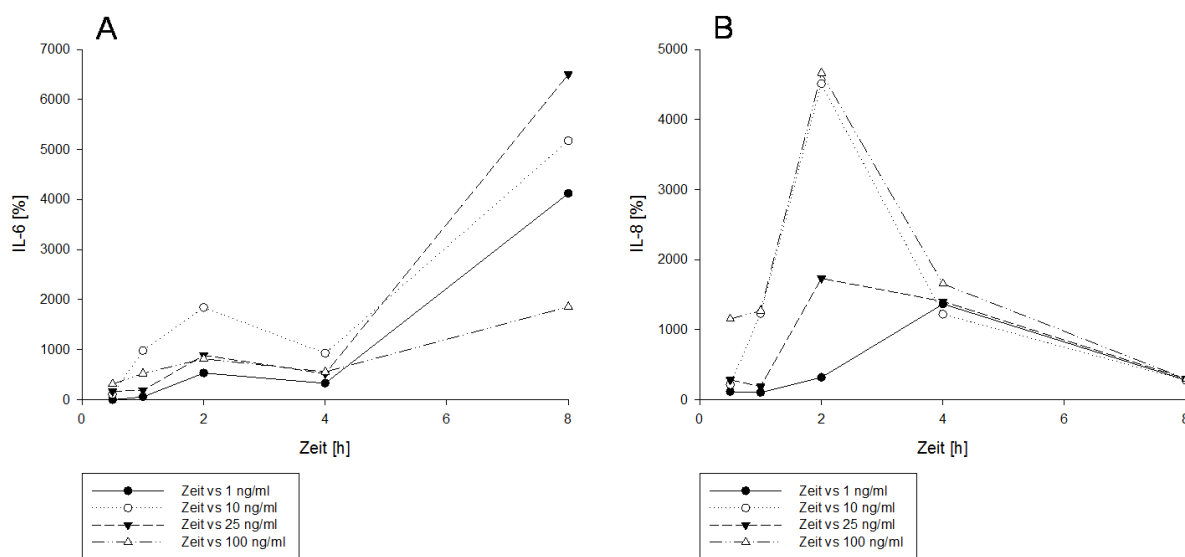


Abbildung 18: **Zeitlicher Verlauf der (A) IL-6- und (B) IL-8-Antwort auf IL-22-Stimulation von Kontroll-CLPF innerhalb der ersten acht Stunden.** Überstände wurden nach 30 Minuten, einer, zwei, vier und acht Stunden abgenommen. Auf der x-Achse ist die Zeit in Stunden aufgetragen. Auf der y-Achse ist die IL-6- bzw. IL-8-Produktion jeweils im Vergleich zur Produktion der unstimulierten Kontrolle in Prozent angegeben. n=2.

4.2.5.2 Zeitlicher Verlauf bis 24 Stunden

Daraufhin wurden Versuche mit gleichen Stimulationskonzentrationen über einen Zeitraum von insgesamt 24 Stunden durchgeführt. Hierbei wurden Überstände nach einer, zwei, vier, acht, zwölf und 24 Stunden abgenommen. Bei einer Stimulation mit 25 ng/ml IL-22 zeigte sich bei diesen Versuchen ein Steady-State nach zwölf Stunden. Bei den anderen Konzentrationen zeigte sich bei der IL-6-Produktion ein Maximum nach zwölf Stunden. (Abbildung 19A)

Die stärkste IL-8-Produktionssteigerung war nach acht Stunden zu detektieren. Nur bei einer IL-22-Konzentration von 10 ng/ml zeigte sich das Maximum nach zwölf Stunden. Bei diesen Versuchen war auch ein erster kleiner Gipfel nach zwei Stunden zu erkennen. Dieser war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei den vorangegangenen Versuchen über acht Stunden. (Abbildung 19B)

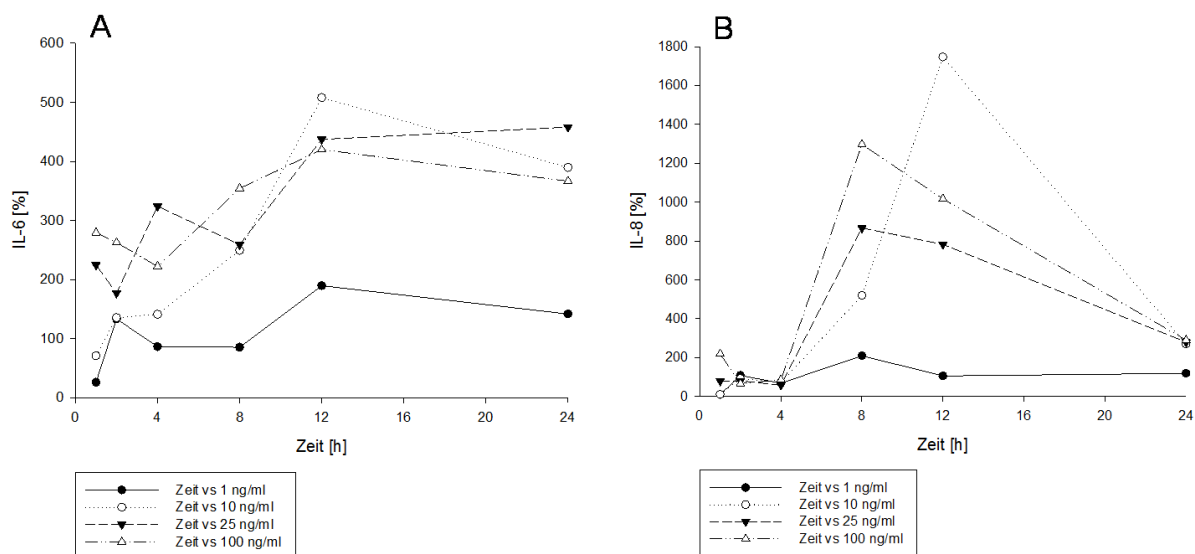


Abbildung 19: **Zeitlicher Verlauf der (A) IL-6- und (B) IL-8-Antwort auf IL-22-Stimulation von Kontroll-CLPF innerhalb der ersten 24 Stunden.** Überstände wurden nach einer, zwei, vier, acht, zwölf und 24 Stunde(n) abgenommen. Auf der x-Achse ist die Zeit in Stunden aufgetragen. Auf der y-Achse ist die IL-6- bzw. IL-8-Produktion jeweils in Vergleich zur Produktion der unstimulierten Kontrolle in Prozent angegeben. n=2.

4.2.5.3 Zeitlicher Verlauf zwischen acht und 48 Stunden

Zur genaueren Bestimmung des zeitlichen Profils der IL-6- und IL-8-Produktion wurde in den darauffolgenden Versuchen der Zeitraum zwischen acht und 48 Stunden beobachtet. Im Folgenden wird bei Stimulation mit 25 ng/ml IL-22 die IL-6- und IL-8-Produktion der Kontroll-CLPF nach acht, zwölf, 24 und 48 Stunden aufgestellt.

Die stärkste Änderung der IL-6-Produktion zeigte sich dabei nach zwölf Stunden. Danach nahm die Steigerung der IL-6-Produktion wieder ab. Hier zeigte sich im Vergleich zu den Versuchen über 24 Stunden kein Steady-State bei 25 ng/ml IL-22. (Abbildung 20A)

Bei der IL-8-Produktion zeigte sich ein Maximum nach acht Stunden. Danach nahm die prozentuale IL-8-Produktionssteigerung kontinuierlich bis 48 Stunden ab. (Abbildung 20B)

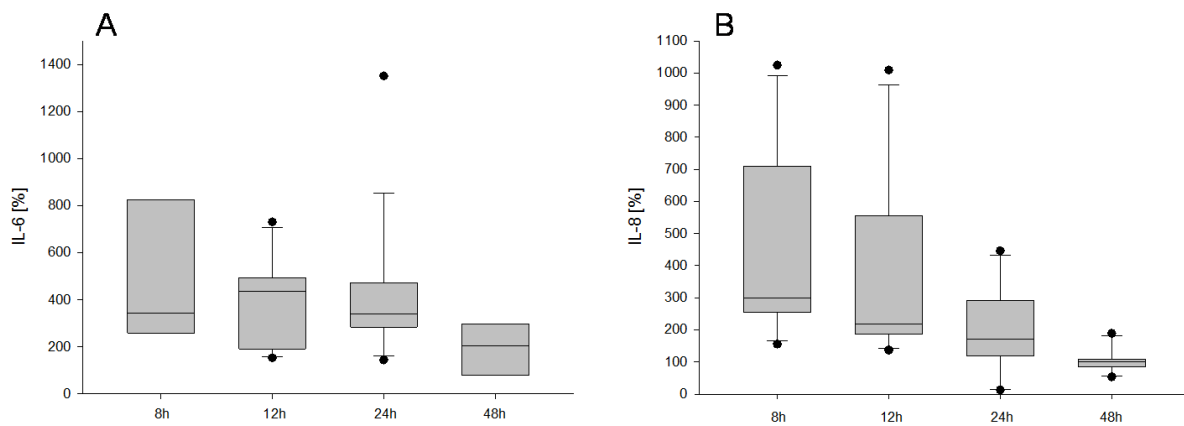


Abbildung 20: **Zeitlicher Verlauf der (A) IL-6- und (B) IL-8-Produktion bei einer Stimulation von Kontroll-CLPF mit 25 ng/ml IL-22.** (A) IL-6- und (B) IL-8-Sekretion sind prozentual im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu dem Zeitpunkt angegeben. Überstände wurden nach acht, zwölf, 24 und 48 Stunden abgenommen.

4.2.6 Zeitlicher Verlauf bei den LPS-kostimulierten Kontroll-CLPF

Unter Einfluss von LPS und IL-22 war die prozentuale Stimulationssteigerung der IL-6- und IL-8-Produktion bei der Kontroll-CLPF nach 24 stärker als nach zwölf Stunden ausgeprägt. Dieser Effekt war bei der IL-6-Produktion deutlicher zu erkennen als bei der IL-8-Produktion. (Abbildung 21)

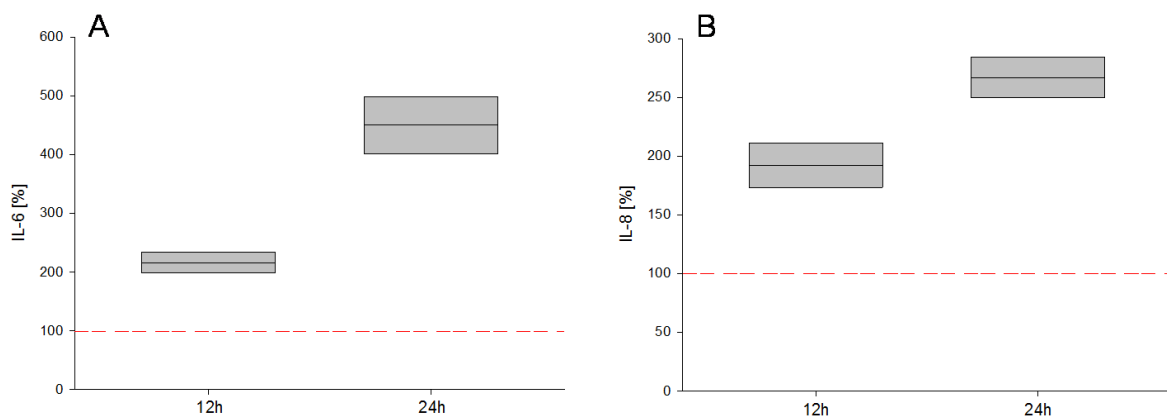


Abbildung 21: **Zeitlicher Verlauf der (A) IL-6- und (B) IL-8-Produktion bei Kontroll-CLPF unter Stimulation mit 25 ng/ml IL-22 und 10 ng/ml LPS.** (A) IL-6- und (B) IL-8-Sekretion sind auf der y-Achse prozentual im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu dem Zeitpunkt angegeben. Überstände wurden nach zwölf und 24 Stunden abgenommen. Die unstimulierte Kontrolle wurde auf 100%-Punkte gesetzt (rote gestrichelte Linie). n=2

4.3 Überprüfung der Induktion von pSTAT1, STAT3, pSTAT3 und pSTAT5

Bei einem weiteren Versuch wurden Kontroll-CLPF mit IL-22 in den Konzentrationen 25, 50, 100 ng/ml stimuliert. Nach 24 Stunden wurde der Versuch beendet und Proteinlysate aus den Zellen der stimulierten Zellen hergestellt.

Bei dem darauffolgenden Western Blot zeigte sich bei Stimulation mit IL-22 eine Induktion von pSTAT1, STAT3 und pSTAT3. (Abbildung 22) Es konnte jedoch keine Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden. Auch der Nachweis von pSTAT5 war nicht erfolgreich.

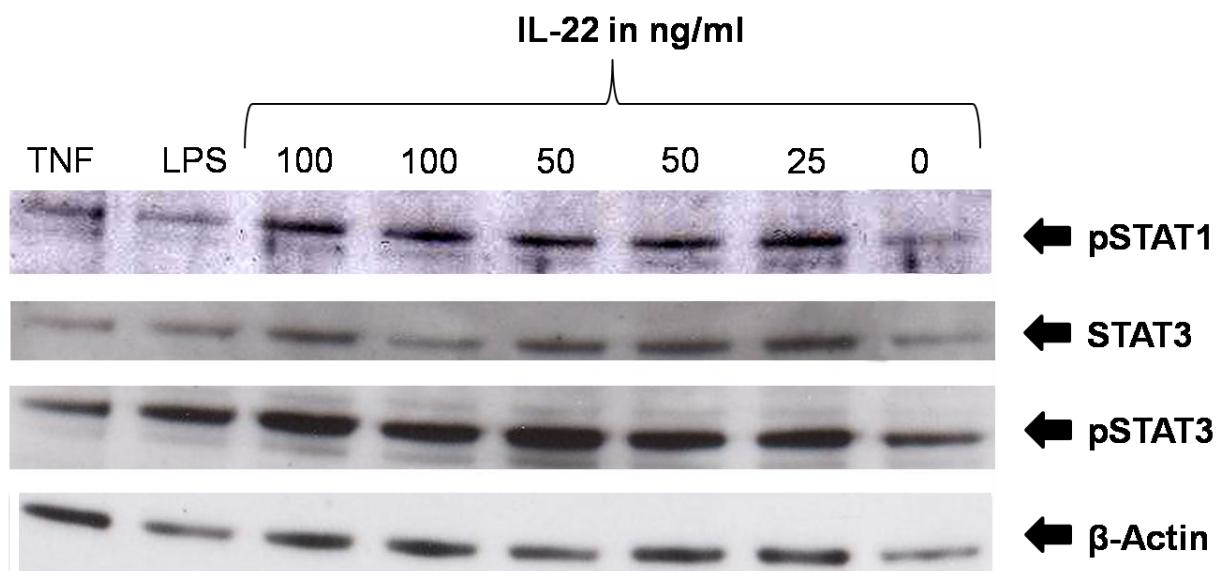


Abbildung 22: IL-22 induziert pSTAT1, STAT3 und pSTAT3 bei Kontroll-CLPF.

4.4 Fibroseparameter

4.4.1 ST-CLPF

4.4.1.1 CTGF

Mittels Taqman wurde der Effekt von IL-22 auf die Expression von CTGF bei den ST-1-CLPF untersucht. Es zeigte sich nach 24 Stunden eine dosisabhängig, vermehrte Expression von CTGF, die jedoch nicht signifikant war. (Abbildung 23)

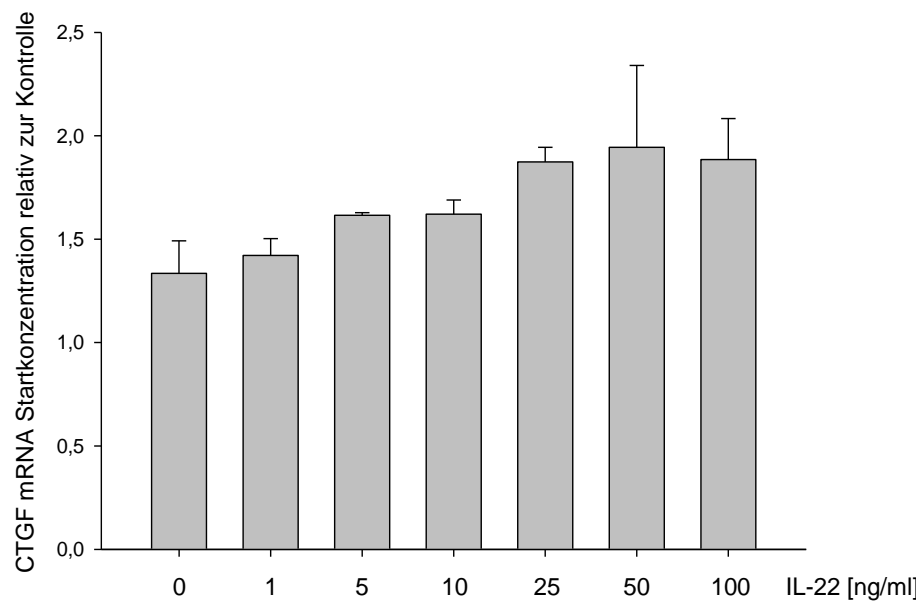


Abbildung 23: **Expressions-Level von CTGF.** Bei MC-Stenose-CLPF kommt es 24 Stunden nach der Stimulation mit IL-22 zu einer vermehrten Expression von CTGF. Auf der x-Achse sind die IL-22-Konzentrationen aufgetragen. n=2

4.4.1.2 Collagen I

Auch der Effekt von IL-22 auf die Collagen I-Expression wurde untersucht. Es kam bei Stimulation mit IL-22 in den Konzentrationen 25 ng/ml und 50 ng/ml zu einer vermehrten Expression von Collagen I. Bei den anderen IL-22-Konzentrationen war kein eindeutiger Effekt festzustellen. (Abbildung 24)

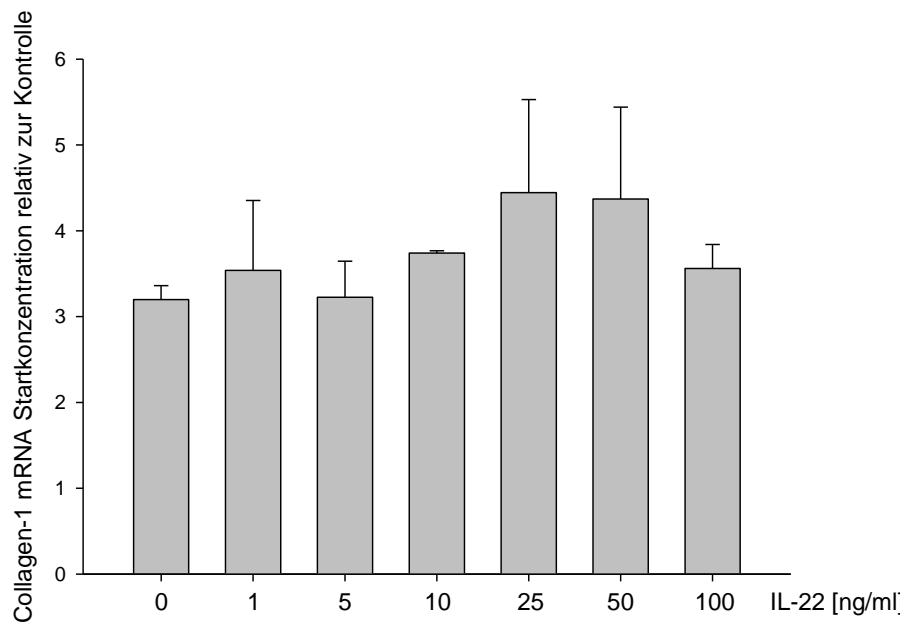


Abbildung 24: **Expressions-Level von Collagen I.** 24 Stunden nach Stimulation mit IL-22 kommt es bei MC-Stenose-CLPF zu einer vermehrten Expression von Collagen-I. Auf der x-Achse sind die IL-22-Konzentrationen aufgetragen. n=2

4.4.2 MC-CLPF

4.4.2.1 CTGF

Es wurden auch MC-2-CLPF mit IL-22 stimuliert und nachfolgend RNA-Lysate hergestellt. Die Taqman-Analyse dieses Versuches zeigte, dass es bei den MC-CLPF 24 Stunden nach der Stimulation mit 50 ng/ml und 100 ng/ml IL-22 zu einer vermehrten Expression von CTGF kam. Diese war jedoch nicht signifikant. (Abbildung 25)

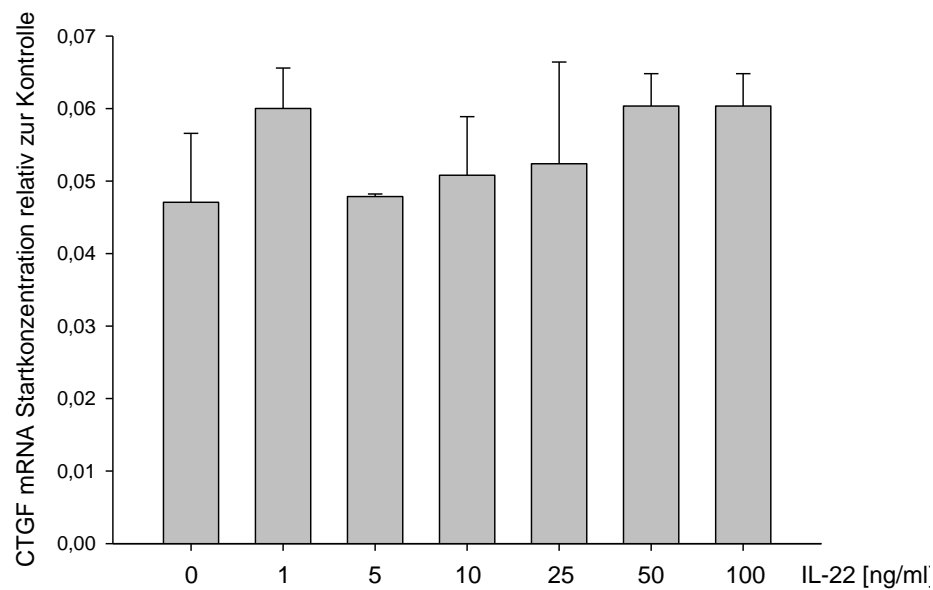


Abbildung 25: **Expressions-Level von CTGF** bei MC-CLPF ohne Stenose 24 Stunden nach Stimulation mit IL-22. Auf der x-Achse sind die IL-22-Konzentrationen aufgetragen. n=2

4.4.2.2 Collagen I

Mittels Taqman wurde auch der Effekt von IL-22 auf die Collagen I-Expression untersucht. Bei den MC-CLPF kam es bei Stimulation mit IL-22 zu einer dosisabhängigen Verminderung der Expression von Collagen I. (Abbildung 26)

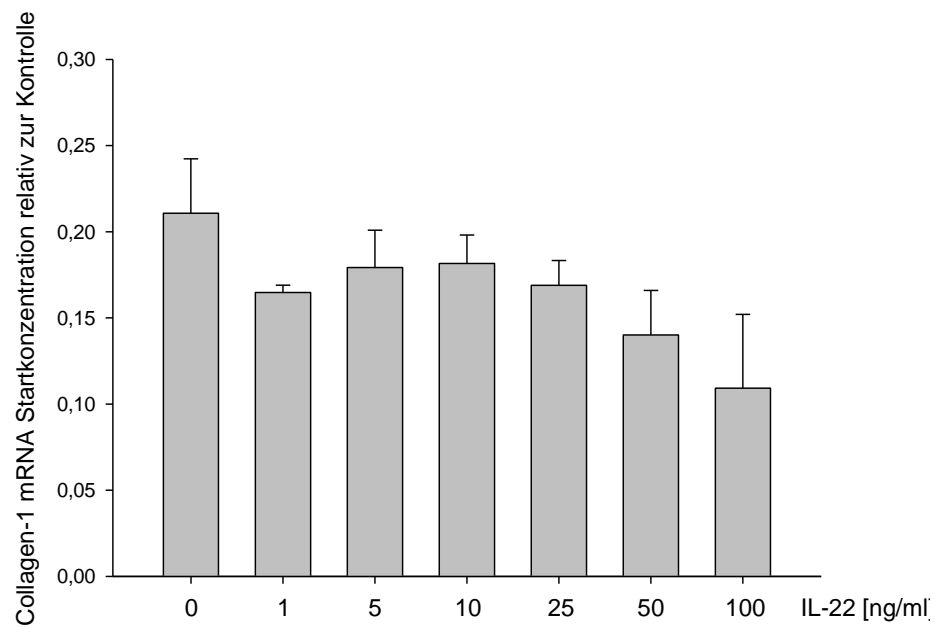


Abbildung 26: **Expressions-Level von Collagen I.** 24 Stunden nach Stimulation von MC-CLPF ohne Stenose mit IL-22 zeigt sich eine dosisabhängige Expressions-Minderung von Collagen I. Auf der x-Achse sind die IL-22-Konzentrationen aufgetragen. n=2

5 Diskussion

IL-22 ist sowohl im Serum als auch im Gewebe des Magen-Darm-Traktes von Morbus Crohn-Patienten in höheren Konzentrationen nachzuweisen als bei gesunden Kontrollen.¹⁰⁹ Im Kontext der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde die Bedeutung von IL-22 bei Colitis-Modellen untersucht und dabei ein protektiver Effekt nachgewiesen.^{75, 77, 104, 113-115}

Auch bei Hepatitis-Modellen konnte IL-22 ein protektiver Effekt nachgewiesen werden. Dieser Effekt beruht unter anderem auf die Induktion mitogener Proteine wie c-myc und CDK4 als auch antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2.¹¹⁶ Darüber hinaus ist IL-22 in der Lunge wichtig zur Abwehr Gram-negativer Erreger wie zum Beispiel *Klebsiella pneumoniae*.¹⁰⁶ Desweiteren wurde eine Besserung des Ventilator-Indizierten Lungenschadens (VILI) nach Inhalation von IL-22 beobachtet.¹¹⁷

Bei Psoriasis wurde IL-22 jedoch eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Erkrankung nachgewiesen. Es spielen hierbei der chemotaktische und proinflammatorische Effekt von IL-22 eine wichtige Bedeutung.^{69, 88, 89, 97, 118}

IL-22 spielt somit vor allem eine Rolle im Magen-Darm-Trakt, der Leber, der Lunge und der Haut. Es besitzt einerseits protektive Effekte, ist aber andererseits auch für Pathologien bei bestimmten Erkrankungen dieser Organsysteme mitverantwortlich. In dieser Arbeit wurde der Effekt von IL-22 auf die Zytokin-Produktion von den CLPF untersucht. Verglichen wurden die CLPF von Morbus Crohn-Patienten mit denen nicht-erkrankter Kontrollen. Nicht nur IL-22 ist im Serum und in der Darmmukosa von MC-Patienten erhöht, sondern auch die beiden untersuchten Zytokine IL-6 und IL-8.¹¹⁹⁻¹²³ Beide werden wie in der vorliegenden Arbeit demonstriert durch IL-22 induziert.

In den Versuchen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede im Verhältnis zwischen dem IL-6/IL-8-Verhältnis nach Stimulation mit IL-22 bei Morbus Crohn-Patienten gegenüber dem IL-6/IL-8-Verhältnis nach IL-22-Stimulation bei gesunden Kontrollen gibt. So kam es bei Kontroll-CLPF nach IL-22-Stimulation zu einer gleichmäßigen Steigerung der IL-6- und IL-8-Produktion. Jenes Verhältnis war bei den MC-CLPF und noch stärker bei den ST-CLPF zugunsten der IL-8-Produktion

verschoben. Dieses spiegelt sich marginal auch im Serum laut einer Untersuchung von Szkaradkiewicz et al.¹¹⁹ wieder. In dieser Arbeit wurde das Serum von MC-Patienten bezüglich der IL-6- und IL-8-Konzentration untersucht. Bei gesunden Kontrollen zeigte sich eine 6,14-fach höhere IL-8- als IL-6-Konzentration im Serum. Bei Patienten, die zur Zeit der Untersuchung an einem aktiven Morbus Crohn litten, zeigte sich eine 6,51-fach höhere IL-8- als IL-6-Konzentration. Noch klarer wird diese Verschiebung des IL-8/IL-6 Quotienten in der Darmmukosa gemäß einer Arbeit von Indaram et al.¹²⁴. Hierbei wurden unter anderem die Konzentrationen von IL-6 und IL-8 in der Darmmukosa gemessen. Die Konzentration von IL-8 war bei den gesunden Kontrollen 9,88-fach höher als die IL-6-Konzentration. In befallenen Darmsegmenten von Morbus Crohn Patienten war die IL-8-Konzentration in der Mukosa 21,41-fach höher als die IL-6-Konzentration. In einer anderen Arbeit fiel auf, dass die IL-6-Konzentration nur in befallenen Darm-Segmenten signifikant höher ist als bei den Kontrollen während die IL-8-Konzentration sowohl in den befallenen wie auch in den nicht befallenen Darmsegmenten signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht ist.¹²⁵ Die Ergebnisse der genannten Arbeiten decken sich mit den Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit. Die IL-22-Signalkaskade spielt somit möglicherweise eine entscheidende Rolle bei dem veränderten IL6-/IL-8-Verhältnis in der Darmmukosa von Morbus Crohn Patienten.

Der unterschiedlichen IL-22 abhängigen IL-6- und IL-8-Induktion bei CLPF von Morbus Crohn Patienten und gesunden Kontrollen könnten möglicherweise STAT3-Mutationen zugrunde liegen, die bei Morbus Crohn beschrieben wurden.⁴⁷ Die Aktivierung von STAT3 durch IL-22 konnte sowohl in dieser als auch in anderen Arbeiten nachgewiesen werden.^{94, 126} Bei der Aktivierung von STAT3 kommt es unter anderem zur Steigerung der IL-8-Produktion.^{127, 128} Durch die Mutation von STAT3 könnte es zu einer vermehrten STAT3-Aktivierung und folglich zu einer vermehrten IL-8-Produktion kommen. In einer Arbeit von Lovato et al. konnte gezeigt werden, dass es bei Morbus Crohn Patienten zu einer vermehrten Aktivierung von STAT3 kommt.¹²⁹ Ob IL-22 zu einer vermehrten STAT3-Aktivierung bei Morbus Crohn CLPF führt, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Es könnten auch Mutationen des NOD2(CARD15)-Gens mit der verhältnismäßig geringeren Induktion von IL-6 gegenüber der Induktion von IL-8 bei Morbus Crohn

CLPF in Zusammenhang stehen. So war es in einer Arbeit von Peeters et al.¹³⁰ möglich bei Monozyten von Crohn-Patienten mit bestimmten NOD2-Polyphormismen eine reduzierte IL-6-Produktion nachzuweisen. NOD2 wird unter anderem von den CLPF exprimiert.¹³¹ Auch konnte in einer Arbeit nachgewiesen werden, dass NOD2 in entzündlichem Gewebe vermehrt exprimiert wird.¹³² Jedoch ist bisher noch kein Nachweis über eine mögliche Beeinflussung des NOD2-Signalwegs durch IL-22 erfolgt.

Eine weitere mögliche Erklärung für die geringere IL-6-Produktion könnte eine verminderte Phosphorylierung von IKappaB sein. Dieser Faktor ist Teil der MAPK/p38-IKappaB-NFKappaB-Signalkaskade und ist für die Induktion der IL-6-Produktion wichtig. Die verminderte Phosphorylierung wurde bei Morbus-Crohn-Patienten bereits in früheren Untersuchungen beobachtet.^{133, 134} IL-22 aktiviert sowohl den MAPK/p38 als auch den JAK1/STAT3 Signalweg. Während am Ende der MAPK/p38-IKappaB-NFKappaB-Signalkaskade eine Induktion sowohl der IL-6- als auch der IL-8-Produktion folgt, zieht die Aktivierung von JAK1/STAT3 lediglich eine Induktion der IL-8-Produktion nach sich.⁹⁰ (Abbildung 27)

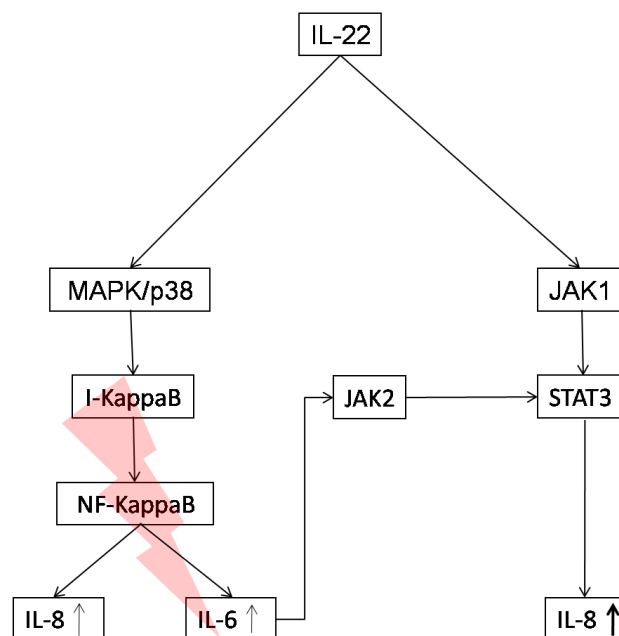


Abbildung 27: Induktionsweg von IL-6 und IL-8 bei Stimulation mit IL-22

Das durch IL-22 induzierte IL-6-/IL-8-Produktions-Verhältnis war am deutlichsten bei den CLPF aus stenosierte Darm-Abschnitten von Morbus Crohn Patienten

zugunsten der IL-8-Produktion verschoben. Fraglich ist, ob IL-8 in direktem Zusammenhang zu der Entwicklung einer Stenose steht oder ob diese Beobachtung ein Begleiteffekt ist. In einer Arbeit von Sheu et al.¹³⁵ konnte bei Pyelonephritiden IL-8 mit einer späteren Narbenbildung in Verbindung gebracht werden. Somit besteht hier der Verdacht, dass die Stenosebildung auch bei Morbus Crohn Patienten mit IL-8 in Zusammenhang steht. Dieser Verdacht wird durch eine weitere Arbeit erhärtet, die zeigt, dass IL-8 unter anderem eine Stimulation der Kollagen-Synthese und Matrix-Produktion bewirkt.¹³⁶ Es zeigte sich hierbei auch, dass das Zusammenspiel zwischen Epithelzellen und CLPF wichtig für die Steigerung der Kollagen- und Matrixsynthese ist. Dieses würde auch begründen, wieso in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Anstieg von Fibrosemarkern nach IL-22-Stimulation zu beobachten war.

Die Sekretion von IL-8 wird durch Sulfasalazin bzw. dem Spaltprodukt Sulfapyridin blockiert.^{137, 138} Bisher gab es jedoch noch keine Beobachtungen über ein verringertes Auftreten von Stenosen bei Morbus Crohn Erkrankten unter Einsatz von Sulfasalazin. Dieses spricht eher dafür, dass die Steigerung der IL-8-Produktion eine Begleiterscheinung und kein Verursacher für die Stenosebildung ist.

An der Stenosebildung könnte auch die verstärkte Aktivierung des JAK/STAT3-Signalwegs in den CLPF beteiligt sein. Dieser wurde schon des Öfteren mit profibrotischen Effekten in Zusammenhang gebracht. STAT3 bewirkt neben der Induktion des proinflammatorischen IL-8 auch die Freisetzung von MUC-1/-3/-10/-13, die für die Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere wichtig sind.^{114, 139, 140} Außerdem kommt es zu einer vermehrten Proliferation von Epithelzellen, welches wiederum mit der Entwicklung der Colitis-assoziierten Tumore in Verbindung gebracht wurde.¹⁴¹⁻¹⁴³ Bei Inhibition von STAT3 mit S3I-201 zeigte sich eine Abschwächung fibrotischer Prozesse in der Niere.¹⁴⁴⁻¹⁴⁷ Auch Triptolid, ein Inhaltsstoff der chinesischen Kletterpflanze Wilfords Dreiflügelfrucht, scheint als Inhibitor des IL-6-induzierten STAT3 zur Verbesserung einer Colitis beizutragen.¹⁴⁸ Ob diese Inhibitoren auch zu einer verminderten Entwicklung von Stenosen bei Morbus Crohn Patienten beitragen, müssen weitere Untersuchungen klären. Die Inhibition von STAT3 scheint im globalen Kontext der Morbus Crohn Erkrankung

einen Benefit trotz der teils protektiven Effekte von STAT3 zu zeigen.¹⁴⁹ Unklar ist inwieweit die IL-22 induzierte STAT3-Aktivierung hierbei von Bedeutung ist.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der Arbeit war herauszufinden, ob es einen Unterschied bei der IL-22 induzierten IL-6- und IL-8-Produktion zwischen gesunden Kontroll-CLPF und Morbus Crohn-CLPF gibt. Außerdem sollte geprüft werden, ob es Unterschiede bei der Induktion bestimmter Fibrosemarker durch IL-22 gibt.

Es zeigte sich ein deutlich stärkeres Übergewicht der IL-22-induzierten IL-8-Produktion gegenüber der IL-22-induzierten IL-6-Produktion bei Morbus Crohn-CLPF während dieses Verhältnis bei den CLPF der gesunden Kontrollen ausgeglichener war. Am deutlichsten war dieses verschobene Verhältnis bei den CLPFs aus stenosierte Darmabschnitten von Morbus Crohn Patienten zu sehen. Mutationen von STAT3, des NOD2-Gens oder einer verminderten Phosphorylierung von IKappaB könnten für diese unterschiedliche Gewichtung verantwortlich sein. In einer neuen Arbeit könnte untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen bestimmten Mutationen von STAT3, NOD2 und des unterschiedlichen IL-6/IL-8-Produktion-Verhältnis nach IL-22-Stimulation gibt. Auch könnte überprüft werden, ob es zu einer verminderten Phosphorylierung von IKappaB bei Morbus Crohn-CLPF nach IL-22-Gabe kommt und ob dieses mit der Produktion von IL-6 und IL-8 korreliert.

Eine signifikant vermehrte Induktion von Fibrosemarkern durch IL-22 konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Grund hierfür könnte jedoch der in dieser Arbeit genutzte isolierte Einsatz von CLPFs sein. Wie in einer Arbeit von Kuhlmann et al.¹³⁶ gezeigt werden konnte, ist zur vermehrten Produktion von Fibrosemarkern eine Interaktion der CLPF mit Epithelzellen nötig. In einer neuen Arbeit könnte mit einem modifizierten Versuchsaufbau, bei dem CLPF und Epithelzellen zusammen eingesetzt werden, die Auswirkungen von IL-22 auf Fibrosemarker untersucht werden.

Diese Arbeit zeigt klar, dass IL-22 einen deutlichen Einfluss auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine von primären CLPF hat und dass sich das Muster der IL-22 induzierten Zytokinsekretion zwischen CLPF aus nicht entzündlichen Darm und von Patienten mit Morbus Crohn qualitativ unterscheidet. In wie weit IL-22 eine Rolle

bei der Pathogenese von Morbus Crohn und der Entstehung von Stenosen spielt, müssen noch weitere Arbeiten zu diesem Thema zeigen. Es bleibt offen, ob der IL-22-Signalweg mit der Induktion von IL-6 und IL-8 Ansätze für neue Therapiemöglichkeiten liefert.

7 Literaturverzeichnis

1. Graham. Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease—an update. 1995.
2. Freeman HJ. Long-term natural history of Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2009;15(11):1315-8.
3. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448(7152):427-34.
4. Fabry W. Ex scirrhus et ulcere cancrum in intestino caeco exorta iliaca passio. In *Opera, observation LXI, Centuriae I*. Frankfurt: 31 J.L. Dufour, 1682:49 cited by Fielding JF. Crohn's disease and Dalziel's syndrome. *J Clin Gastroent*, 1988;10:279. In.
5. Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001;7(2):175-84.
6. Goldstein HI. The history of regional enteritis. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* 1950;80(38):1035-6.
7. Morgagni G. The seats and causes of disease investigated by anatomy.; 1769.
8. Dalziel T. Chronic interstitial enteritis. *Br Med J (Clin Res)* 1913;2:1068.
9. Crohn BB GL, Oppenheimer GD. Regional ileitis: A pathologic and clinical entity. *JAMA* 1932;99:1323.
10. Lopez Serrano P, Perez Calle JL, Carrera Alonso E, et al. Epidemiologic study on the current incidence of inflammatory bowel disease in Madrid. *Rev Esp Enferm Dig* 2009;101(11):768-72.
11. Hassler D, Braun R. [Antibiosis instead of the scalpel: new findings for Crohn disease]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 2009;134(1-2):p1.
12. Goh K, Xiao SD. Inflammatory bowel disease: a survey of the epidemiology in Asia. *Journal of digestive diseases* 2009;10(1):1-6.
13. Morita N, Toki S, Hirohashi T, et al. Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Japan: nationwide epidemiological survey during the year 1991. *Journal of gastroenterology* 1995;30 Suppl 8:1-4.
14. Yoshida Y, Murata Y. Inflammatory bowel disease in Japan: studies of epidemiology and etiopathogenesis. *The Medical clinics of North America* 1990;74(1):67-90.

15. Loftus EV, Jr., Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR. Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gastroenterology* 1998;114(6):1161-8.
16. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39(5):690-7.
17. Ott C, Obermeier F, Thielers S, et al. The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *European journal of gastroenterology & hepatology* 2008;20(9):917-23.
18. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev* 2002;15(1):79-94.
19. Yuksel I, Ataseven H, Basar O, et al. Peripheral Arthritis in the Course of Inflammatory Bowel Diseases. *Digestive diseases and sciences*.
20. Yuksel I, Basar O, Ataseven H, et al. Mucocutaneous manifestations in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 2009;15(4):546-50.
21. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Yu N. The prevalence of extraintestinal diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *The American journal of gastroenterology* 2001;96(4):1116-22.
22. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie* 2005;19 Suppl A:5-36.
23. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;55(6):749-53.
24. Lahat A, Chowers Y. The patient with recurrent (sub) obstruction due to Crohn's disease. *Best practice & research* 2007;21(3):427-44.
25. Michelassi F, Stella M, Balestracci T, Giuliani F, Marogna P, Block GE. Incidence, diagnosis, and treatment of enteric and colorectal fistulae in patients with Crohn's disease. *Annals of surgery* 1993;218(5):660-6.

26. Schwartz DA, Loftus EV, Jr., Tremaine WJ, et al. The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 2002;122(4):875-80.
27. Nielsen OH, Rogler G, Hahnloser D, Thomsen OO. Diagnosis and management of fistulizing Crohn's disease. *Nature clinical practice* 2009;6(2):92-106.
28. Michelassi F, Block GE. Surgical management of Crohn's disease. *Advances in surgery* 1993;26:307-22.
29. Solomon MJ. Fistulae and abscesses in symptomatic perianal Crohn's disease. *International journal of colorectal disease* 1996;11(5):222-6.
30. Cosnes J, Cattan S, Blain A, et al. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 2002;8(4):244-50.
31. Herrlinger K, Wittig B, Stange EF. [Chronic inflammatory intestinal diseases. Pathophysiology and therapy]. *Der Internist* 2009;50(10):1229-46; quiz 47.
32. Nielsen OH, Bjerrum JT, Csillag C, Nielsen FC, Olsen J. Influence of smoking on colonic gene expression profile in Crohn's disease. *PloS one* 2009;4(7):e6210.
33. Card T, Logan RF, Rodrigues LC, Wheeler JG. Antibiotic use and the development of Crohn's disease. *Gut* 2004;53(2):246-50.
34. Comes MC, Gower-Rousseau C, Colombel JF, et al. Inflammatory bowel disease in married couples: 10 cases in Nord Pas de Calais region of France and Liege county of Belgium. *Gut* 1994;35(9):1316-8.
35. Singh K, Saunders JH, Foley RJ. Inflammatory bowel disease in married couples. *Gut* 1995;37(1):158.
36. Holmes GK, Painter NS. Crohn's disease in married couples. *Gut* 1986;27(3):350.
37. Whorwell PJ, Hodges JR, Bamforth J, Wright R. Crohn's disease in husband and wife. *Lancet* 1981;1(8215):334.
38. Man SM, Zhang L, Day AS, Leach S, Mitchell H. Detection of enterohepatic and gastric helicobacter species in fecal specimens of children with Crohn's disease. *Helicobacter* 2008;13(4):234-8.
39. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998;115(6):1405-13.

40. Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infection and immunity* 1999;67(9):4499-509.
41. Zhang L, Man SM, Day AS, et al. Detection and isolation of *Campylobacter* species other than *C. jejuni* from children with Crohn's disease. *Journal of clinical microbiology* 2009;47(2):453-5.
42. Shafran I, Johnson LK. An open-label evaluation of rifaximin in the treatment of active Crohn's disease. *Current medical research and opinion* 2005;21(8):1165-9.
43. Pranter C, Lochs H, Campieri M, et al. Antibiotic treatment of Crohn's disease: results of a multicentre, double blind, randomized, placebo-controlled trial with rifaximin. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2006;23(8):1117-25.
44. Muniyappa P, Gulati R, Mohr F, Hupertz V. Use and safety of rifaximin in children with inflammatory bowel disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2009;49(4):400-4.
45. Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, Lepage P, Raedler A, Schreiber S. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflammatory bowel diseases* 2008;14(7):968-76.
46. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine* 1991;324(2):84-8.
47. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature genetics* 2008;40(8):955-62.
48. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411(6837):599-603.
49. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411(6837):603-6.
50. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *American journal of human genetics* 2002;70(4):845-57.

51. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature genetics* 2007;39(7):830-2.
52. Weersma RK, Zhernakova A, Nolte IM, et al. ATG16L1 and IL23R are associated with inflammatory bowel diseases but not with celiac disease in the Netherlands. *The American journal of gastroenterology* 2008;103(3):621-7.
53. Glas J, Konrad A, Schmechel S, et al. The ATG16L1 gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to Crohn's disease in the German population. *The American journal of gastroenterology* 2008;103(3):682-91.
54. Fowler EV, Doecke J, Simms LA, et al. ATG16L1 T300A shows strong associations with disease subgroups in a large Australian IBD population: further support for significant disease heterogeneity. *The American journal of gastroenterology* 2008;103(10):2519-26.
55. Wehkamp J, Wang G, Kubler I, et al. The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J Immunol* 2007;179(5):3109-18.
56. Hancock L, Beckly J, Geremia A, et al. Clinical and molecular characteristics of isolated colonic Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 2008;14(12):1667-77.
57. Koslowski MJ, Kubler I, Chamaillard M, et al. Genetic variants of Wnt transcription factor TCF-4 (TCF7L2) putative promoter region are associated with small intestinal Crohn's disease. *PloS one* 2009;4(2):e4496.
58. Weersma RK, Stokkers PC, van Bodegraven AA, et al. Molecular prediction of disease risk and severity in a large Dutch Crohn's disease cohort. *Gut* 2009;58(3):388-95.
59. Sabat R, Wallace E, Endesfelder S, Wolk K. IL-19 and IL-20: two novel cytokines with importance in inflammatory diseases. *Expert opinion on therapeutic targets* 2007;11(5):601-12.
60. Wolk K, Sabat R. Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells. *Cytokine & growth factor reviews* 2006;17(5):367-80.

61. Dumoutier L, Van Roost E, Colau D, Renauld JC. Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97(18):10144-9.
62. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature immunology* 2009;10(8):857-63.
63. Wolk K, Kunz S, Asadullah K, Sabat R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol* 2002;168(11):5397-402.
64. Dumoutier L, Van Roost E, Ameye G, Michaux L, Renauld JC. IL-TIF/IL-22: genomic organization and mapping of the human and mouse genes. *Genes and immunity* 2000;1(8):488-94.
65. Dumoutier L, Louahed J, Renauld JC. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J Immunol* 2000;164(4):1814-9.
66. Fickenscher H, Hor S, Kupers H, Knappe A, Wittmann S, Sticht H. The interleukin-10 family of cytokines. *Trends in immunology* 2002;23(2):89-96.
67. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annual review of immunology* 2004;22:929-79.
68. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of experimental medicine* 2006;203(10):2271-9.
69. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, et al. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007;445(7128):648-51.
70. Cupedo T, Crellin NK, Papazian N, et al. Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells. *Nature immunology* 2009;10(1):66-74.
71. Takatori H, Kanno Y, Watford WT, et al. Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *The Journal of experimental medicine* 2009;206(1):35-41.

72. Wolk K, Witte K, Witte E, et al. Maturing dendritic cells are an important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes. *Journal of leukocyte biology* 2008;83(5):1181-93.
73. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nature immunology* 2009;10(8):864-71.
74. Volpe E, Servant N, Zollinger R, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nature immunology* 2008;9(6):650-7.
75. Pickert G, Neufert C, Leppkes M, et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *The Journal of experimental medicine* 2009;206(7):1465-72.
76. Volpe E, Touzot M, Servant N, et al. Multiparametric analysis of cytokine-driven human Th17 differentiation reveals a differential regulation of IL-17 and IL-22 production. *Blood* 2009;114(17):3610-4.
77. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Stevens S, Flavell RA. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 2008;29(6):947-57.
78. Cella M, Fuchs A, Vermi W, et al. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 2009;457(7230):722-5.
79. Dhiman R, Indramohan M, Barnes PF, et al. IL-22 produced by human NK cells inhibits growth of *Mycobacterium tuberculosis* by enhancing phagolysosomal fusion. *J Immunol* 2009;183(10):6639-45.
80. Mus AM, Cornelissen F, Asmawidjaja PS, et al. Interleukin-23 promotes Th17 differentiation by inhibiting T-bet and FoxP3 and is required for elevation of interleukin-22, but not interleukin-21, in autoimmune experimental arthritis. *Arthritis and rheumatism*;62(4):1043-50.
81. Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, et al. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *The Journal of biological chemistry* 2001;276(4):2725-32.

82. Xie MH, Aggarwal S, Ho WH, et al. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(40):31335-9.
83. Dumoutier L, Leemans C, Lejeune D, Kotenko SV, Renauld JC. Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. *J Immunol* 2001;167(7):3545-9.
84. Wang M, Tan Z, Zhang R, Kotenko SV, Liang P. Interleukin 24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(9):7341-7.
85. Aggarwal S, Xie MH, Maruoka M, Foster J, Gurney AL. Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22. *J Interferon Cytokine Res* 2001;21(12):1047-53.
86. Langer JA, Cutrone EC, Kotenko S. The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions. *Cytokine & growth factor reviews* 2004;15(1):33-48.
87. Lecart S, Morel F, Noraz N, et al. IL-22, in contrast to IL-10, does not induce Ig production, due to absence of a functional IL-22 receptor on activated human B cells. *International immunology* 2002;14(11):1351-6.
88. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004;21(2):241-54.
89. Wolk K, Witte E, Wallace E, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *European journal of immunology* 2006;36(5):1309-23.
90. Andoh A, Zhang Z, Inatomi O, et al. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 2005;129(3):969-84.
91. Li J, Tomkinson KN, Tan XY, et al. Temporal associations between interleukin 22 and the extracellular domains of IL-22R and IL-10R2. *International immunopharmacology* 2004;4(5):693-708.
92. Logsdon NJ, Jones BC, Josephson K, Cook J, Walter MR. Comparison of interleukin-22 and interleukin-10 soluble receptor complexes. *J Interferon Cytokine Res* 2002;22(11):1099-112.

93. Logsdon NJ, Jones BC, Allman JC, et al. The IL-10R2 binding hot spot on IL-22 is located on the N-terminal helix and is dependent on N-linked glycosylation. *Journal of molecular biology* 2004;342(2):503-14.
94. Lejeune D, Dumoutier L, Constantinescu S, Kruijer W, Schuringa JJ, Renauld JC. Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(37):33676-82.
95. Zhang W, Chen Y, Wei H, et al. Antiapoptotic activity of autocrine interleukin-22 and therapeutic effects of interleukin-22-small interfering RNA on human lung cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 2008;14(20):6432-9.
96. Sa SM, Valdez PA, Wu J, et al. The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *J Immunol* 2007;178(4):2229-40.
97. Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 2005;174(6):3695-702.
98. Rollman O, Jensen UB, Ostman A, Bolund L, Gustafsdottir SM, Jensen TG. Platelet derived growth factor (PDGF) responsive epidermis formed from human keratinocytes transduced with the PDGF beta receptor gene. *The Journal of investigative dermatology* 2003;120(5):742-9.
99. Wei CC, Ho TW, Liang WG, Chen GY, Chang MS. Cloning and characterization of mouse IL-22 binding protein. *Genes and immunity* 2003;4(3):204-11.
100. Dumoutier L, Lejeune D, Colau D, Renauld JC. Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *J Immunol* 2001;166(12):7090-5.
101. Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, et al. Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity. *J Immunol* 2001;166(12):7096-103.
102. Xu W, Presnell SR, Parrish-Novak J, et al. A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98(17):9511-6.

103. Weiss B, Wolk K, Grunberg BH, et al. Cloning of murine IL-22 receptor alpha 2 and comparison with its human counterpart. *Genes and immunity* 2004;5(5):330-6.
104. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *The Journal of clinical investigation* 2008;118(2):534-44.
105. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Flavell RA. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 2007;27(4):647-59.
106. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nature medicine* 2008;14(3):275-81.
107. te Velde AA, de Kort F, Sterrenburg E, et al. Comparative analysis of colonic gene expression of three experimental colitis models mimicking inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 2007;13(3):325-30.
108. Wolk K, Witte E, Hoffmann U, et al. IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J Immunol* 2007;178(9):5973-81.
109. Schmechel S, Konrad A, Diegelmann J, et al. Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status. *Inflammatory bowel diseases* 2008;14(2):204-12.
110. Brenmoehl. Bedeutung von Fibronectin Spleißvarianten für die Migration primärer Colon lamina propria Fibroblasten bei unterschiedlichen klinischen Subtypen von Morbus Crohn. 2007.
111. Leeb SN, Vogl D, Falk W, Scholmerich J, Rogler G, Gelbmann CM. Regulation of migration of human colonic myofibroblasts. *Growth factors (Chur, Switzerland)* 2002;20(2):81-91.
112. Brenmoehl J, Miller SN, Hofmann C, et al. Transforming growth factor-beta 1 induces intestinal myofibroblast differentiation and modulates their migration. *World J Gastroenterol* 2009;15(12):1431-42.
113. Leppkes M, Becker C, Ivanov, II, et al. RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* 2009;136(1):257-67.

114. Ho SB, Dvorak LA, Moor RE, et al. Cysteine-rich domains of muc3 intestinal mucin promote cell migration, inhibit apoptosis, and accelerate wound healing. *Gastroenterology* 2006;131(5):1501-17.
115. Neufert C, Pickert G, Zheng Y, et al. Activation of epithelial STAT3 regulates intestinal homeostasis. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*;9(4):652-5.
116. Radaeva S, Sun R, Pan HN, Hong F, Gao B. Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2004;39(5):1332-42.
117. Hoegl S, Bachmann M, Scheiermann P, et al. Protective Properties of Inhaled IL-22 in a Model of Ventilator-induced Lung Injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology*.
118. Ma HL, Liang S, Li J, et al. IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation. *The Journal of clinical investigation* 2008;118(2):597-607.
119. Szkaradkiewicz A, Marciniak R, Chudzicka-Strugala I, et al. Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 2009;57(4):291-4.
120. Yamamoto T, Nakahigashi M, Umegae S, Kitagawa T, Matsumoto K. Impact of elemental diet on mucosal inflammation in patients with active Crohn's disease: cytokine production and endoscopic and histological findings. *Inflammatory bowel diseases* 2005;11(6):580-8.
121. Kohut M, Hartleb M, Hartleb T. [Significance of serum concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines in identification of patients with Crohn's disease]. *Pol Merkur Lekarski*;29(171):169-72.
122. Kohut M, Kacperek-Hartleb T, Sojka D, Hartleb M. [Serum level of TNF-alpha receptor type II better correlates with severity of Crohn's disease than other cytokines and conventional clinical activity indicators]. *Pol Merkur Lekarski*;28(168):454-8.
123. Niederau C, Backmerhoff F, Schumacher B, Niederau C. Inflammatory mediators and acute phase proteins in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hepato-gastroenterology* 1997;44(13):90-107.
124. Indaram AV, Visvalingam V, Locke M, Bank S. Mucosal cytokine production in radiation-induced proctosigmoiditis compared with inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology* 2000;95(5):1221-5.

125. Sher ME, D'Angelo AJ, Stein TA, Bailey B, Burns G, Wise L. Cytokines in Crohn's colitis. *American journal of surgery* 1995;169(1):133-6.
126. Brand S, Beigel F, Olszak T, et al. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *American journal of physiology* 2006;290(4):G827-38.
127. Yeh M, Gharavi NM, Choi J, et al. Oxidized phospholipids increase interleukin 8 (IL-8) synthesis by activation of the c-src/signal transducers and activators of transcription (STAT)3 pathway. *The Journal of biological chemistry* 2004;279(29):30175-81.
128. Gharavi NM, Alva JA, Mouillesseaux KP, et al. Role of the Jak/STAT pathway in the regulation of interleukin-8 transcription by oxidized phospholipids in vitro and in atherosclerosis in vivo. *The Journal of biological chemistry* 2007;282(43):31460-8.
129. Lovato P, Brender C, Agnholt J, et al. Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(19):16777-81.
130. Peeters H, Bogaert S, Laukens D, et al. CARD15 variants determine a disturbed early response of monocytes to adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 in Crohn's disease. *International journal of immunogenetics* 2007;34(3):181-91.
131. Otte JM, Rosenberg IM, Podolsky DK. Intestinal myofibroblasts in innate immune responses of the intestine. *Gastroenterology* 2003;124(7):1866-78.
132. Keller JF, Carrouel F, Staquet MJ, et al. Expression of NOD2 is increased in inflamed human dental pulps and lipoteichoic acid-stimulated odontoblast-like cells. *Innate immunity* 2009.
133. Seidelin JB, Broom OJ, Olsen J, Nielsen OH. Evidence for impaired CARD15 signalling in Crohn's disease without disease linked variants. *PloS one* 2009;4(11):e7794.
134. Chou CH, Chen SU, Cheng JC. Radiation-induced interleukin-6 expression through MAPK/p38/NF-kappaB signaling pathway and the resultant antiapoptotic effect on endothelial cells through Mcl-1 expression with sIL6-Ralpha. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2009;75(5):1553-61.
135. Sheu JN, Chen SM, Meng MH, Lue KH. The role of serum and urine interleukin-8 on acute pyelonephritis and subsequent renal scarring in children. *The Pediatric infectious disease journal* 2009;28(10):885-90.

136. Kuhlmann UC, Chwieralski CE, Reinhold D, Welte T, Buhling F. Radiation-induced matrix production of lung fibroblasts is regulated by interleukin-8. *International journal of radiation biology* 2009;85(2):138-43.
137. Volin MV, Campbell PL, Connors MA, Woodruff DC, Koch AE. The effect of sulfasalazine on rheumatoid arthritic synovial tissue chemokine production. *Experimental and molecular pathology* 2002;73(2):84-92.
138. Peltier MR, Tee SC, Kinzler WL, Smulian JC. Effect of sulfasalazine on basal and bacteria-stimulated interleukin-8 production by endocervical epithelial cells. *Am J Reprod Immunol* 2009;61(3):190-5.
139. Shirazi T, Longman RJ, Corfield AP, Probert CS. Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgraduate medical journal* 2000;76(898):473-8.
140. Corfield AP, Carroll D, Myerscough N, Probert CS. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front Biosci* 2001;6:D1321-57.
141. Bollrath J, Greten FR. IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO reports* 2009;10(12):1314-9.
142. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer cell* 2009;15(2):103-13.
143. Wang Z, Jin H, Xu R, Mei Q, Fan D. Triptolide downregulates Rac1 and the JAK/STAT3 pathway and inhibits colitis-related colon cancer progression. *Experimental & molecular medicine* 2009;41(10):717-27.
144. Chuang PY, He JC. JAK/STAT signaling in renal diseases. *Kidney international*;78(3):231-4.
145. Pang M, Ma L, Gong R, et al. A novel STAT3 inhibitor, S3I-201, attenuates renal interstitial fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney international*;78(3):257-68.
146. Lim CP, Phan TT, Lim IJ, Cao X. Cytokine profiling and Stat3 phosphorylation in epithelial-mesenchymal interactions between keloid keratinocytes and fibroblasts. *The Journal of investigative dermatology* 2009;129(4):851-61.
147. Lim CP, Phan TT, Lim IJ, Cao X. Stat3 contributes to keloid pathogenesis via promoting collagen production, cell proliferation and migration. *Oncogene* 2006;25(39):5416-25.

148. Li Y, Yu C, Zhu WM, et al. Triptolide ameliorates IL-10-deficient mice colitis by mechanisms involving suppression of IL-6/STAT3 signaling pathway and down-regulation of IL-17. *Molecular immunology*;47(15):2467-74.
149. Bai A, Hu P, Chen J, et al. Blockade of STAT3 by antisense oligonucleotide in TNBS-induced murine colitis. *International journal of colorectal disease* 2007;22(6):625-35.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Florian Obermeier, der mich zu jeder Zeit stets als Freund, Berater und Unterstützer begleitet hat.

Auch möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Fichtner-Feigl, dem 2. Begutachter dieser Arbeit, bedanken.

Desweiteren gilt mein besonderer Dank auch an Frau Dr. rer. nat. Claudia Hofmann, die immer wieder konstruktive Kritik an meiner Laborarbeit leistete.

Auch viele Experimente sind nur durch die Unterstützung und ausführliche Erklärung durch die Mitarbeiterinnen des Labors zustande gekommen: Irina Fink, Nadja Dunger, Nicole Grunwald. Auch bei Ihnen möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Anna Gerlach danke ich herzlichst für ihre konstruktiven grammatikalischen Verbesserungsvorschläge in dieser Arbeit.

Meiner Familie gilt der größte Dank, da sie mir dieses alles erst ermöglicht hat. Nicht nur in schwierigen Momenten hielten sie mir den Rücken frei und hatten Verständnis, wenn ich aufgrund der Arbeit mal nicht die weite Strecke in den hohen Norden zurücklegen konnte.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an meine Kollegin Frau Margareta Manka, mit der ich zusammen viele Fibroblasten durch gute und schlechte Zeiten gebracht habe.

9 Curriculum Vitae

Name	Stefan Ernst Hajo Loose
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Ledig
Geburtsdatum	01.11.1984
Geburtsort	Kiel
Bildungsweg	1991 – 1992 Grundschule am Sonderburger Platz in Kiel 1992 – 1995 Grund- und Hauptschule Suchsdorf 1995 – 2001 Realschule Kronshagen 2001 – 2004 Wirtschaftsgymnasium Ravensberg, Kiel (Abitur)
Zivildienst	2004 – 2005 Malteser Hilfsdienst, Kiel
Studium	Wintersemester 2005: Beginn des Medizinstudiums an der Universität Regensburg September 2007 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Oktober 2011 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung